



Santander, 21 de Junio de 2021

Mecanismos moleculares implicados en los efectos antidepresivos de LY404187

Máster Oficial en Biología molecular
y Biomedicina. UC y UPV/EHU

Laura Casasampere Baranda
Tutor: Albert Adell Calduch PhD

Trabajo Fin de Máster presentado por Laura Casasampere Baranda, realizado durante el curso académico 2020/2021 en el Instituto de Biomedicina y Biotecnología/CSIC de Cantabria, en el grupo de investigación “Neurobiología de Sistemas” cuyo investigador principal es Albert Adell.

Santander, a 21 de junio de 2021

Autora del Trabajo Fin de Máster:
Máster:

Tutor del Trabajo Fin de

Fdo: Laura Casasampere Baranda

Fdo: Albert Adell Calduch

ÍNDICE

	<u>Pág.</u>
Resumen/Abstract	3
1. Introducción	4
1.1 <i>Trastorno depresivo mayor</i>	4
1.2 <i>Alteraciones asociadas al trastorno depresivo mayor</i>	5
1.3 <i>Tratamientos antidepresivos</i>	7
1.3.1 <i>Tratamientos convencionales: hipótesis adrenérgica y monoaminérgica</i>	7
1.3.2 <i>Nuevos tratamientos para el trastorno depresivo: la implicación del sistema glutamatérgico en la depresión y la hipótesis neurogénica</i> ..	8
1.3.3 <i>Las Ampakinas como potenciales antidepresivos de acción rápida</i> .	13
1.3.4 <i>Regulación de la traducción local por mTOR y ERK</i>	14
2. Objetivos e Hipótesis	18
3. Metodología	19
3.1 <i>Metodología</i>	19
3.2 <i>Análisis estadístico</i>	19
4. Resultados	20
4.1 <i>Efecto antidepresivo de LY404187 en el TNF</i>	20
4.2 <i>Efecto antidepresivo de LY404187 en el NSFT</i>	20
4.3 <i>Modificación de la liberación de neurotransmisores en respuesta al tratamiento con LY404187</i>	21
4.4 <i>Cambios en los marcadores de plasticidad sináptica y en la expresión de proteínas implicadas en la sinapsis de glutamato</i>	22
5. Discusión	29
6. Conclusiones	32
7. Materiales y pruebas utilizadas	34
7.1 <i>Animales</i>	34
7.2 <i>Tratamientos farmacológicos</i>	34
7.3 <i>Microdiálisis</i>	35
7.4 <i>Tinción de cortes cerebrales con hematoxilina</i>	36
7.5 <i>Test de natación forzada</i>	36
7.6 <i>Test de alimentación con supresión de novedades</i>	37
7.7 <i>Western Blot</i>	38
8. Referencias bibliográficas	41

Resumen

El descubrimiento de que la ketamina, un antagonista del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), producía efectos antidepresivos rápidos (en solo 2 h después de una única administración sistémica) y sostenidos (que duraron hasta 7 días) dirigió la atención de la fisiopatología de la depresión de las monoaminas al glutamato. Se ha descrito que el efecto antidepresivo de la ketamina desaparece si se bloquea los receptores AMPA. Por esta razón se pensó que una estimulación directa de los AMPARs produciría un efecto antidepresivo. Sin embargo, la estimulación directa de AMPARs puede dar lugar a convulsiones por lo que, recientemente, los esfuerzos se han dedicado al desarrollo de potenciadores alostéricos del AMPAR como un medio de incrementar la neuroplasticidad necesaria para el tratamiento de la depresión.

LY 404187 es un modulador alostérico positivo de alto impacto de los AMPARs que ralentiza su desactivación o desensibilización prolongando sus efectos. Nuestros resultados han demostrado que LY 404187 tiene un efecto antidepresivo rápido en ratas Sprague-Dawley (aparece a los 30 min) y sostenido (dura hasta 7 días) medido en el test de natación forzada. En experimentos de microdiálisis se ha observado que LY 404187 aumenta la liberación de serotonina en la corteza prefrontal sin alterar la de glutamato. Por otra parte, los estudios de *Western blotting* han demostrado que LY 404187 aumenta la síntesis de BDNF a los 30 minutos de su administración sistémica. En conclusión, la potenciación de los AMPARs por LY 404187 posee una acción antidepresiva rápida sin producir excitotoxicidad debida a un exceso de liberación de glutamato.

Abstract

The discovery that ketamine, an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist, produced rapid (in just 2 h after a single systemic administration) and sustained (lasting up to 7 days) antidepressant effects led to the attention to the pathophysiology of depression from monoamines to glutamate. The antidepressant effect of ketamine has been reported to disappear if AMPA receptors are blocked. For this reason it was thought that a direct stimulation of AMPARs would produce an antidepressant effect. However, direct stimulation of AMPARs can lead to seizures, so recently, efforts have been devoted to the development of allosteric enhancers of AMPAR as a means of increasing the neuroplasticity necessary for the treatment of depression.

LY 404187 is a high impact positive allosteric modulator of AMPARs that slows down their deactivation or desensitization, prolonging their effects. Our results have shown that LY 404187 has a rapid antidepressant effect in Sprague-Dawley rats (appears at 30 min) and sustained (lasts up to 7 days) measured in the forced swimming test. In microdialysis experiments, it has been observed that LY 404187 increases the release of serotonin in the prefrontal cortex without altering that of glutamate. On the other hand, Western blotting studies have shown that LY 404187 increases BDNF synthesis 30 minutes after its systemic administration. In conclusion, the potentiation of AMPARs by LY 404187 has a rapid antidepressant action without producing excitotoxicity due to an excess release of glutamate.

Palabras clave/Keywords: LY404187, Ketamina, receptor AMPA, ampaquinas, moduladores alostéricos para AMPA, glutamato, plasticidad neuronal, depresión mayor, tratamiento antidepresivo

1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de que la ketamina, un antagonista del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), producía efectos antidepresivos rápidos y sostenidos, dirigió la atención de la fisiopatología de la depresión de las monoaminas al glutamato. El glutamato es el principal mediador de la transmisión sináptica excitadora en el cerebro de los mamíferos que, en condiciones normales, juega un papel destacado en la plasticidad sináptica pero, en condiciones patológicas desencadena una neurotoxicidad rápida o retardada que puede variar desde cambios atróficos (muy probablemente relevantes para ciertos trastornos psiquiátricos como el TDM) hasta la muerte celular manifiesta. Por tanto, se requeriría una regulación estricta sobre la neurotransmisión glutamatérgica para mantener una función neuronal óptima sin los inconvenientes provocados por los mecanismos por los que parece actuar la ketamina. Ésta, al inhibir el canal de los receptores NMDA, provoca una posterior liberación y aumento de glutamato al afectar también a los receptores NMDA de las interneuronas GABAérgicas, dejándolas inactivadas y perdiendo su función reguladora de liberación de glutamato que interactuaría, a su vez, con los canales AMPA. Por otra parte, la acción rápida antidepresiva de la ketamina, parece estar relacionada, de esta manera, con efectos indirectos sobre la señalización del receptor AMPA y la vía de señalización ERK/AKT>mTOR que daría lugar a una potenciación sináptica mediada por AMPA. Los antidepresivos convencionales (IRS, IRSN) también causan potenciación sináptica, pero lo hacen posteriormente al aumentar el ARNm del BDNF del cerebro en la glía, no en las neuronas, modulando múltiples variantes de ARNm de BDNF (exones I, IV y VI) a través de un mecanismo mediado por la vía de señalización de ERK ([Hisaoka-Nakashima et al., 2016](#)). Teniendo en cuenta que la potenciación y proliferación de espinas dendríticas en el SNC es importante para múltiples de sus funciones, entre otras, la de regular las emociones desde la corteza prefrontal, encontrar compuestos que modularan los efectos del glutamato sin perder los beneficios neurotróficos y antidepresivos rápidos y sostenidos de éste, es el objetivo de este estudio.

1.1 Trastorno depresivo mayor

La depresión es uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo, y causa una importante carga de discapacidad y enfermedad. La depresión o trastorno depresivo mayor (TDM), según el Manual diagnóstico y estadístico de trastornos mentales 5ª edición (DSM-5, 2014), es la enfermedad mental más común. Se estima que alrededor de 300 millones de personas padecen TDM ([GBD](#)

2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2018). En 2020, la depresión alcanzó la categoría desafortunada de la principal causa de discapacidad en todo el mundo y es uno de los principales contribuyentes a la carga global de morbilidad global, como se indica en los hechos clave de la OMS (30 de enero de 2020).

Las personas con depresión resistente al tratamiento (TRD), a menudo definida en términos generales como la imposibilidad de lograr una respuesta o remisión a al menos un ensayo antidepresivo probado con una dosis y duración adecuadas, representan casi 64 mil millones del costo total de la depresión. Dado que aproximadamente un tercio de los pacientes deprimidos se consideran "resistentes al tratamiento", este grupo representa de manera desproporcionada la mayor carga de morbilidad, lo que subraya la importancia de la innovación y el descubrimiento en esta área (Ionescu et al., 2015). En el peor de los casos, la depresión puede llevar al suicidio, la OMS calcula que hay 850 000 casos de suicidio cada año (OMS, 2019) y por cada suicidio, hay muchas más tentativas de suicidio cada año. El suicidio es la tercera causa de muerte para los jóvenes de edades comprendidas entre los 15 y los 19 años. Todo esto pone de manifiesto la necesidad de encontrar nuevas alternativas que tengan mayor eficacia en el tratamiento del TDM.

La heterogeneidad de la depresión, junto con la falta actual de predictores biológicos fiables de la respuesta a agentes individuales, son factores importantes, así como la alta tasa de recaídas y remitentes, hacen necesaria aspirar a la remisión al inicio del tratamiento en pacientes con depresión, y la necesidad de mejorar las estrategias de tratamiento para lograrlo.

1.2 Alteraciones asociadas al trastorno depresivo mayor

El desarrollo de nuevas terapias más eficaces se ha visto generalmente obstaculizado por un deficiente conocimiento de la fisiopatología de la depresión. En este sentido, la mejora de dicho conocimiento a nivel molar, celular y molecular, así como el hallazgo de biomarcadores válidos de la enfermedad son de especial importancia para el desarrollo de nuevas terapias de acción más rápida y sostenida que la de los actuales fármacos antidepresivos.

Teniendo en cuenta que, en la depresión se dan una amplia gama de síntomas que están mediados por diferentes áreas cerebrales: recompensa y motivación (núcleo accumbens), miedo y ansiedad (amígdala), bajo estado de ánimo (sistema límbico),

alteraciones cognitivas y de regulación de las emociones (corteza prefrontal (CPF) e hipocampo), así como síntomas vegetativos, como cambios en la secreción de hormonas, apetito y sueño (hipotálamo). Teniendo esto en cuenta, se puede deducir que lo que ocurre en los sujetos deprimidos es una alteración de los circuitos implicados en el control de las emociones, así como de determinadas funciones fisiológicas. La identificación de los sustratos neuroanatómicos que median las manifestaciones clínicas del TDM en los dominios cognitivo, afectivo, de recompensa/motivación y límbico plantea un desafío, ya que los tratamientos deben abordar la disfunción en estas múltiples áreas del cerebro ([Anderson et al., 2012](#)).

Una de las teorías que tratan de dar explicación a estas alteraciones es la hipótesis neurogénica de la depresión, la cual postula que en la depresión se dan alteraciones morfofuncionales en diferentes áreas cerebrales provocadas por una disminución de factores neurotróficos. Algunos de los estudios más importantes que apoyan esta teoría son los siguientes:

- Pacientes con depresión tienen un volumen del hipocampo izquierdo 19% más pequeño estadísticamente que los sujetos de comparación, sin volúmenes más pequeños de regiones de comparación (amígdala, caudado, lóbulo frontal y lóbulo temporal) o volumen cerebral total ([Bremner et al. 2000](#))
- La cascada celular AMPc-MAPcinasas-CREB-BDNF puede desempeñar un papel importante en los mecanismos de reestructuración dendrítica, aumento de la neurogénesis del hipocampo y supervivencia de las células nerviosas ([Arantes et. al, 2006](#)).
- Es posible que exista apoptosis fisiológica en la muerte de neuronas deterioradas que no puedan establecer conexiones fuertes y apoptosis patológica debido a la vía del estrés, es decir, el eje HPA ([Arantes et. al, 2006](#)).
- El lapso de tiempo de 2 a 6 semanas de terapia que es necesario para obtener la eficacia antidepresiva indica un requisito para la regulación a largo plazo de las moléculas activadas por el tratamiento farmacológico. Por lo tanto, el enfoque de la investigación sobre antidepresivos se ha ampliado desde el examen de los mecanismos agudos mediados por monoaminas para incluir reguladores transcripcionales a largo plazo como la proteína de unión al

elemento de respuesta al AMPc (CREB) y factores tróficos como el factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro BDNF ([Malberg et al. 2005](#)).

1.3 Tratamientos antidepresivos

1.3.1 Tratamientos convencionales: hipótesis adrenérgica y monoaminérgica:

Los tratamientos antidepresivos clásicos de primera generación como la imipramina, actúan principalmente favoreciendo la neurotransmisión monoaminérgica (sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y/o dopaminérgico), ya que se sabe que en la corteza cerebral estos neurotransmisores juegan un papel importante en la regulación de los procesos que están alterados en la depresión: percepción, cognición y motivación ([Koot y cols., 2012](#)), no obstante, tenían el inconveniente de producir efectos secundarios indeseables. Así, los tratamientos más utilizados en las últimas décadas son los de segunda generación, es decir, (más del 90% de los fármacos comercializados) han sido los inhibidores selectivos de la recaptación de monoaminas y los inhibidores de la monoamina oxidasa, enzima que degrada la serotonina (5-HT). Sin embargo, no se sabe con certeza el mecanismo por el cual ejercen su efecto antidepresivo y tienen una eficacia limitada, además de tardar mucho tiempo en hacer efecto y necesitar de tratamientos de segunda línea según los perfiles de los pacientes.

No obstante, sabemos que los estabilizadores del estado de ánimo como el litio y el valproato activan selectivamente el promotor IV de BDNF en neuronas corticales de cultivo primario de rata. Por tanto, es posible que los antidepresivos también puedan modular la expresión de variantes de ARNm de BDNF específicas y, de hecho, lo hacen (Tabla 1). Antidepresivos con distintos mecanismos de acción, como la amitriptilina, la clomipramina, duloxetina y fluvoxamina, aumentan la expresión de ARNm de BDNF en cultivos microgliales y astrocíticos. En concreto, el tratamiento con antidepresivos aumenta la expresión de los exones I, IV y VI en astrocitos y microglia a través de una modulación dependiente de ERK. Todo ello indica que las células no neuronales son un objetivo importante de los antidepresivos y respaldan aún más el argumento de que la producción glial de BDNF es un papel crucial en el efecto terapéutico de los antidepresivos ([Hisaoka-Nakashima et al., 2016](#)). Si ello pudiera confirmarse, podría ser una explicación de los tiempos a corto, medio y largo plazo de acción de este tipo de fármacos que, tendrían en común con las moléculas que modelan la transmisión glutamatérgica,

procesos de neugénesis indirectos para los cuales, los receptores AMPA cumplirían una función imprescindible.

Tabla 1. Niveles de ARNm de BDNF total relativo (BDNF/GAPDH total, en comparación con el basal) en microglía y astrocitos corticales de cultivo primario de rata		
Drogas	Astrocitos	Microglia
Basal	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
Amitriptilina	3,16 ± 0,44 **	2,92 ± 0,38 **
Clomipramina	7,80 ± 1,43 **	4,92 ± 1,06 **
Duloxetina	7,66 ± 1,79 **	3,95 ± 0,66 **
Fluvoxamina	1,97 ± 0,54 *	3,95 ± 0,54 **
Cocaína	0,85 ± 0,04	0,98 ± 0,09

Las células se trataron con 25 μ M de amitriptilina, clomipramina, fluoxetina, duloxetina o cocaína durante 6 h, y se analizó la expresión de ARNm de BDNF total mediante PCR en tiempo real. Los valores se muestran como la proporción de ARNm total de BDNF a ARNm de GAPDH. Los datos se expresan como la media \pm SEM (relación a Basal) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. basal (prueba t de Student; $n = 3-10$) (Extraída de Hisaoka-Nakashima et al., 2016)

1.3.2 Nuevos tratamientos para el trastorno depresivo: la implicación del sistema glutamatérgico en la depresión y la hipótesis neurogénica

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central. Como consecuencia de su liberación en las sinapsis produce cambios a corto plazo (excitabilidad postsináptica), pero también a largo plazo (cambios en la estabilidad sináptica y la neuroplasticidad mediante la regulación de sistemas de segundos mensajeros, activación indirecta de receptores de membrana y expresión de genes). Los principales receptores de glutamato implicados en la depresión son los receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) (Figura 1).

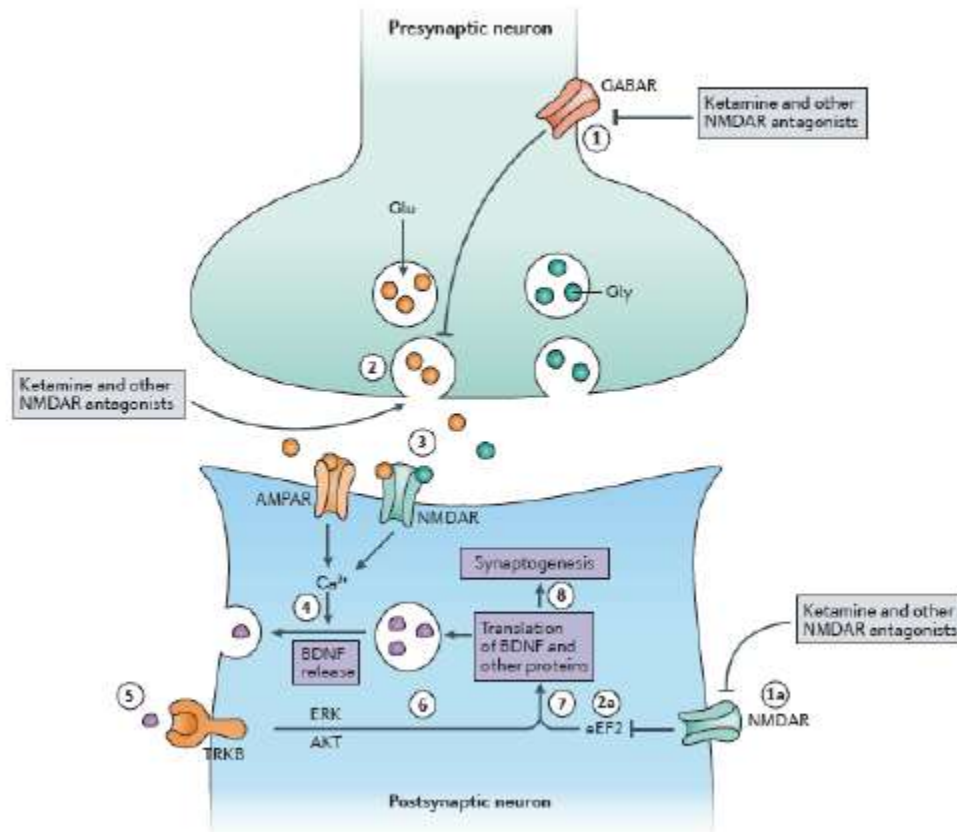


Figura 1. Esquema de la sinapsis glutamatergica. Cabe destacar el papel de los receptores NMDA extrasinápticos que al ser también antagonizados por la Ketamina, produce los efectos excitotóxicos al perder la sinapsis, la capacidad de regular la cantidad de glutamato liberado. Otro aspecto a destacar son los efectos sinérgicos de los receptores AMPAR y NMDAR para producir BDNF.

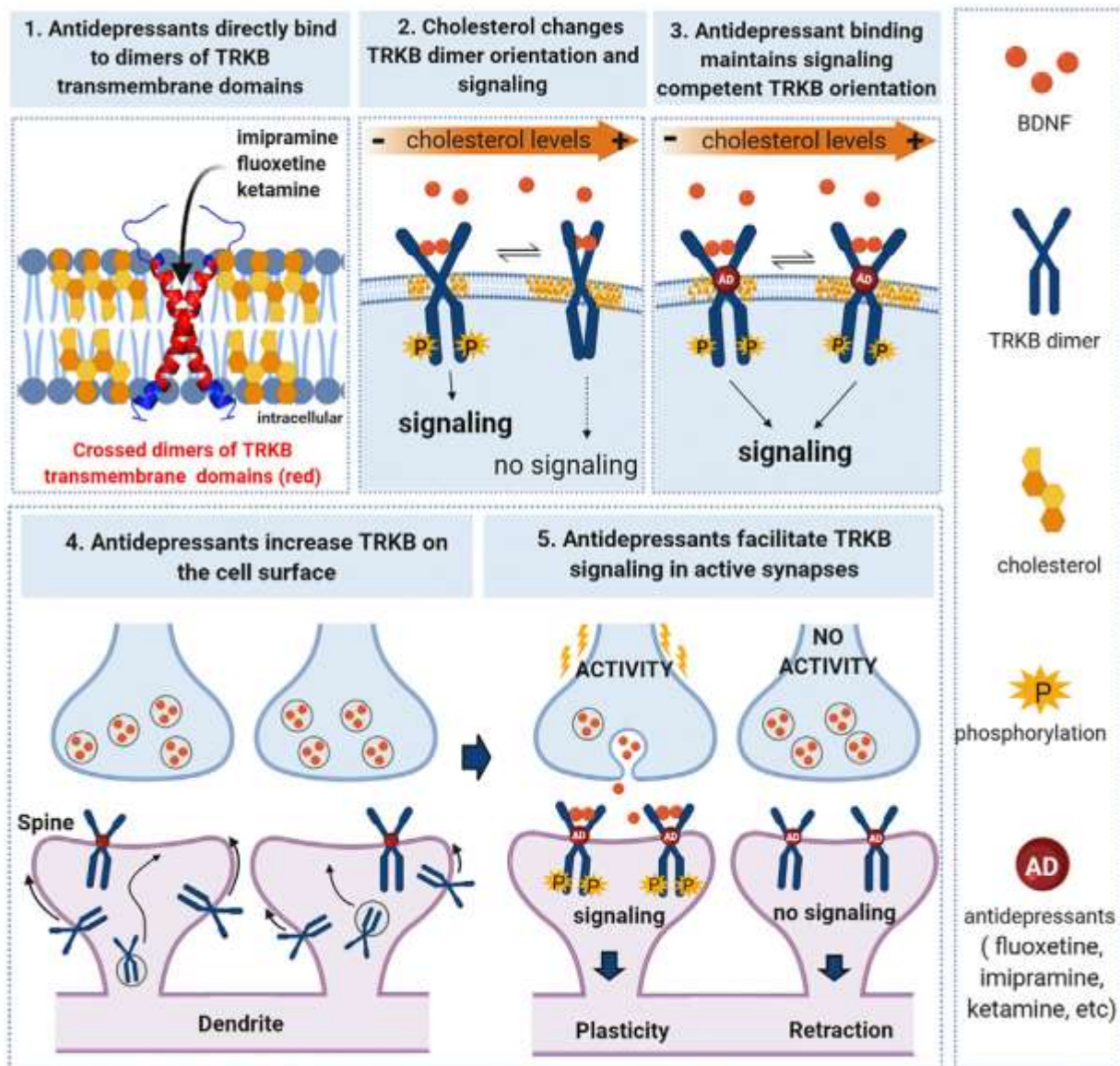


Figura 2. Los fármacos antidepresivos actúan uniéndose directamente a receptores de neurotrofina TRKB. Varios antidepresivos, incluidos los ISRS y la ketamina, enlazan directamente con TRKB. La dimerización de TRKB en la región transmembrana forma una unión bolsillo para fluoxetina. La unión del antidepresivo a TRKB facilita la acción del BDNF y plasticidad. La mutación puntual en la región transmembrana TRKB bloquea la efectos de los antidepresivos. (Extraído de Casarotto et al. 2021)

Desde un punto de vista estructural, los AMPAR se componen de cuatro subunidades, a saber, GluA1 - GluA4, que están codificadas por los genes GRIA1 -

GRIA4 que pueden estar sujetos a modificaciones postranscripcionales, como la edición y corte y empalme de ARN (Sommer et al., 1990; Rueter y col., 1995). Estas modificaciones controlan la amplitud y duración de las corrientes postsinápticas excitadoras (EPSC). Los AMPAR se pueden ensamblar como tetrámeros de diferentes combinaciones de las cuatro subunidades.

Una característica destacada de la composición de la subunidad de los AMPAR es que los que carecen de la subunidad GluA2 (que contienen principalmente la subunidad GluA1) son permeables a los iones Ca^{2+} (Figura 3), lo que los convierte en buenos candidatos como mediadores de procesos celulares y moleculares que conducen a la plasticidad sináptica. De hecho, estos AMPAR que carecen de GluA2 proporcionan un mecanismo de entrada de Ca^{2+} en la célula que induce LTP o LTD independientemente de la activación del receptor NMDA (Cull-Candy et al., 2006; Liu y Zukin, 2007; Lüscher y Malenka, 2011). Las observaciones experimentales han informado que cambios tan robustos en la transmisión sináptica pueden ser inducidos por una estimulación tetánica corta y pueden mantenerse durante horas e incluso días (Choquet y Hosy, 2020).

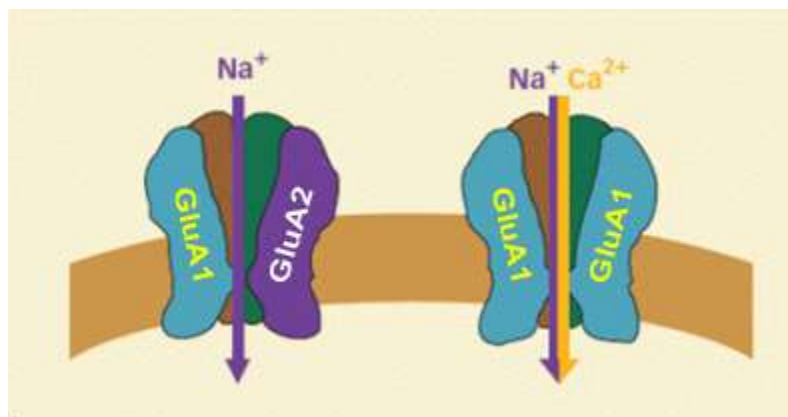


Figura 3. Los receptores AMPA que contienen la subunidad GluA2 permiten predominantemente solo el paso de iones Na^+ al interior de la célula. Sin embargo, los receptores AMPA que carecen de la subunidad GluA2 también son permeables a los iones Ca^{2+} , un ión importante para desencadenar la potenciación a largo plazo pero que en exceso, produce toxicidad celular. La cuestión es que parece ser que la subunidad GluA1 es relevante en el trastorno depresivo mayor por este papel en la plasticidad sináptica y entrada de Ca^{2+} .

Reproducido de "NIDA. El receptor de glutamato poco común prolifera después de la abstinencia de cocaína. Sitio web del Instituto Nacional sobre el Abuso de Drogas.

<https://archives.drugabuse.gov/news-events/nida-notes/2009/12/rare-glutamate-receptor-proliferates-after-cocaine-withdrawal>. 1 de diciembre de 2009. Consultado el 15 de diciembre de 2020.

Los receptores NMDA son tetrámeros compuestos por 2 subunidades NR1 y 2 subunidades NR2 (y de forma menos frecuente por subunidades NR3). Su activación es dependiente de una despolarización inicial, la cual normalmente está mediada por los receptores AMPA (Kew y Kemp, 2005). Un hallazgo importante es que mientras la actuación sobre los receptores NMDA sinápticos promueve la activación de vías neurotróficas (expresión de BDNF), la activación de los receptores NMDA extrasinápticos (así como una activación excesiva de los sinápticos) implica la señalización de vías apoptóticas (Hardingham y Bading, 2010). Se cree que esta activación extrasináptica tiene un papel importante en la excitotoxicidad y la pérdida sináptica asociadas con la depresión (Abdallah y cols., 2015).

Los rápidos efectos antidepresivos de la ketamina dependen de la activación de los AMPAR por una mayor liberación de glutamato en la corteza prefrontal (PFC) (Maeng et al., 2008; Li et al., 2010; Koike et al., 2011), un mecanismo compartido por otra terapia antidepresiva como la estimulación cerebral profunda (DBS) (Jiménez-Sánchez et al., 2016). La ketamina puede atravesar la barrera hematoencefálica e inicialmente se creía que su efecto era debido sólo a su acción como antagonista no competitivo de los receptores NMDA (inhibiendo los receptores NMDA extrasinápticos y los localizados en interneuronas inhibitorias), pero estudios recientes apuntan a que su acción antidepresiva puede ser ejercida por uno de sus metabolitos, la (2R,6R)-hidroxinorketamina, a través de la activación de los receptores AMPA, y que cuando esta activación ocurre de forma independiente al bloqueo de los receptores NMDA, no se producen los efectos disociativos propios del tratamiento con ketamina (Zanos y cols. 2016). Este hallazgo, junto al hecho de que el bloqueo de los receptores AMPA elimina el efecto antidepresivo de la ketamina (Maeng y cols., 2008) y a que otros antagonistas de los receptores NMDA carecen del efecto rápido de ésta, sugieren que podría no ser necesario actuar directamente sobre estos receptores, sino sobre los AMPA.

Por todo ello, los receptores AMPA de glutamato constituyen una interesante diana para el desarrollo de nuevos fármacos antidepresivos de acción más rápida y eficaz que los que existen en la actualidad.

1.3.3 Las Ampakinas como potenciales antidepresivos de acción rápida

Las ampaquinas son una clase novedosa de compuestos sintéticos (Quirk et al. 2002) que fueron diseñados inicialmente para tratar la pérdida de la cognición, el aprendizaje y la memoria, procesos biológicos relacionados con el envejecimiento que se atribuyeron a una transmisión glutamatérgica debilitada (Lynch, 2006; Lynch y Gall, 2006). Por tanto, las ampaquinas facilitarían la neurotransmisión glutamatérgica en las sinapsis corticales.

Desde un punto de vista farmacológico, las ampaquinas se subdividen en dos clases diferentes (Arai et al., 2002) conocidas como ampaquinas de bajo impacto y de alto impacto (Figura 4). Las ampaquinas de bajo impacto aceleran preferentemente la apertura del canal pero no alteran la desensibilización del receptor y no alteran la afinidad de unión al agonista. Sin embargo, las ampaquinas de alto impacto, como LY404187 (Gates et al., 2001), interfieren con la desensibilización del receptor y mejoran la unión del agonista. A diferencia de las ampaquinas de alto impacto, las ampaquinas de bajo impacto no parecen producir efectos adversos pro-convulsivos incluso después de la administración de dosis altas debido a que no altera los niveles de glutamato.

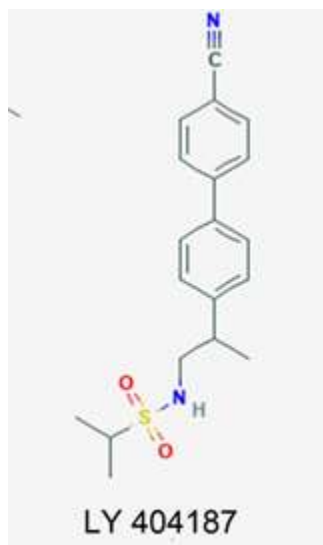


Figura 4. Estructura química de la ampakina de alto impacto LY404187

Como se mencionó anteriormente, varias líneas de evidencia sugieren la importancia de los AMPAR en el tratamiento del TDM. Primero, la estimulación directa de AMPAR induce efectos similares a los de los antidepresivos (Akinfiresoye y Tizabi, 2013; Jiménez-Sánchez et al., 2016). En segundo lugar, el bloqueo de AMPAR atenúa o suprime estos efectos similares a los de los antidepresivos (Maeng et al., 2008; Li et al., 2010; Farley et al., 2010; Koike et al., 2011). En tercer lugar, la activación de AMPAR muestra efectos beneficiosos sobre la plasticidad sináptica (Diering y Huganir, 2018) y el rendimiento cognitivo (Hampson et al., 1998; Lynch y Gall, 2006; Partin, 2015), dos dominios afectados en la depresión. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la estimulación de AMPAR podría ser una buena alternativa terapéutica para tratar el TDM (Kunugi et al., 2019). Sin embargo, la estimulación excesiva de AMPAR por los agonistas de AMPAR completos puede conducir a actividad psicoestimulante y convulsiva (Meldrum, 1994). En cambio, los moduladores alostéricos positivos (PAM), también conocidos como ampaquinas, se unen alostéricamente a los AMPAR y ralentizan la velocidad de su desactivación o desensibilización (Lynch, 2006), prolongando así la duración de las respuestas mediadas por AMPAR (Lapidus et al., 2013). Debido a que las ampaquinas no activan directamente los AMPAR, los fármacos solo son eficaces con una transmisión glutamatérgica subyacente (Arai et al., 1996). Por esta razón, se planteó la hipótesis de que las ampaquinas tendrían potencial terapéutico como fármacos antidepresivos (Alt et al., 2005; Alt et al., 2006; Bleakman et al., 2007; O'Neill y Witkin, 2007).

Uno de los indicios importantes a favor de la posible acción antidepresiva de los potenciadores de AMPAR es el hecho de que estos compuestos tienen la capacidad de aumentar la síntesis del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Zafra et al., 1990; Lindefors et al., 1992; Hayashi et al., 1999; Lauterborn et al., 2000; Legutko et al., 2001; Mackowiak et al., 2002; Radin et al., 2018; Shen et al., 2019).

1.3.4 Regulación de la traducción local por mTOR y ERK

mTOR y ERK son dos vías de señalización estrechamente relacionadas entre sí (Fig. 5). Además de otros estímulos, el BDNF es capaz de activar estas vías para regular la tasa de traducción local dendrítica (Takei et al., 2004), así como facilitar diversos tipos de plasticidad a largo plazo (revisado Panja y Bramham, 2014). La interacción del BDNF con su receptor TrkB (Tropomyosin receptor Kinase B)

produce la activación de PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) (Figura 2), capaz de activar a su vez a AKT1 (Protein Kinase B), ya sea de forma directa o a través de PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) (Casarotto et al., 2021) (Fig. 5 y 6). AKT1 fosforila a mTOR, activándola. Además, AKT1 inhibe a TSC, un complejo inhibidor de mTOR. Por su parte, una vez activada, la quinasa mTOR puede fosforilar a las proteínas inhibidoras de la traducción 4E-BPs (eIF4E-binding proteins), lo que resulta en una activación de la síntesis de proteínas dependiente del factor de inicio de la traducción eIF4E. Por otra parte, mTOR puede fosforilar a p70S6K (ribosomal protein S6 Kinase), una quinasa que fosforila a la proteína ribosómica S6. La proteína S6 fosforilada fomenta la traducción de los denominados “TOP mRNAs”, que codifican a su vez otras proteínas ribosómicas, así como factores de traducción, por lo que la activación de S6 favorece la síntesis de la maquinaria molecular necesaria para la síntesis de proteínas. Por otra parte, el BDNF también produce la activación de la vía Ras-ERK (Fig. 6). ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) fosforila a Mnk1 (Mitogen-activated protein kinase integrating kinase 1), que a su vez es capaz de fosforilar a eIF4E, incrementándose así la síntesis de proteínas dependientes de dicho factor. Estas rutas de señalización son complejas, y de hecho no constituyen dos vías completamente paralelas, sino que pueden influirse mutuamente (Fig. 5, 6 y 11). Así, por ejemplo, ERK puede fosforilar a PDK1 (Phosphoinositide-dependent Kinase 1) a través de RSK (p90 ribosomal S6 kinase) (Frödin et al., 2000), produciendo una activación de la vía Akt-mTOR (Tsokas et al., 2007). La activación de Calpain-2 por ERK (Zadran et al., 2010) también promueve la activación de mTOR, siendo además necesaria para que se lleva a cabo la síntesis de proteínas dendríticas inducida por BDNF en el hipocampo (Briz et al., 2013). A su vez, también PI3K influye sobre la actividad de ERK, a través de MEK (MAPK/ERK kinase) (Tsokas et al., 2007).

Diversos trabajos han puesto de manifiesto el papel relevante de mTOR como mediador de la plasticidad sináptica inducida por BDNF (Cammalleri et al., 2003; Hou y Klann, 2004; Tang et al., 2002).

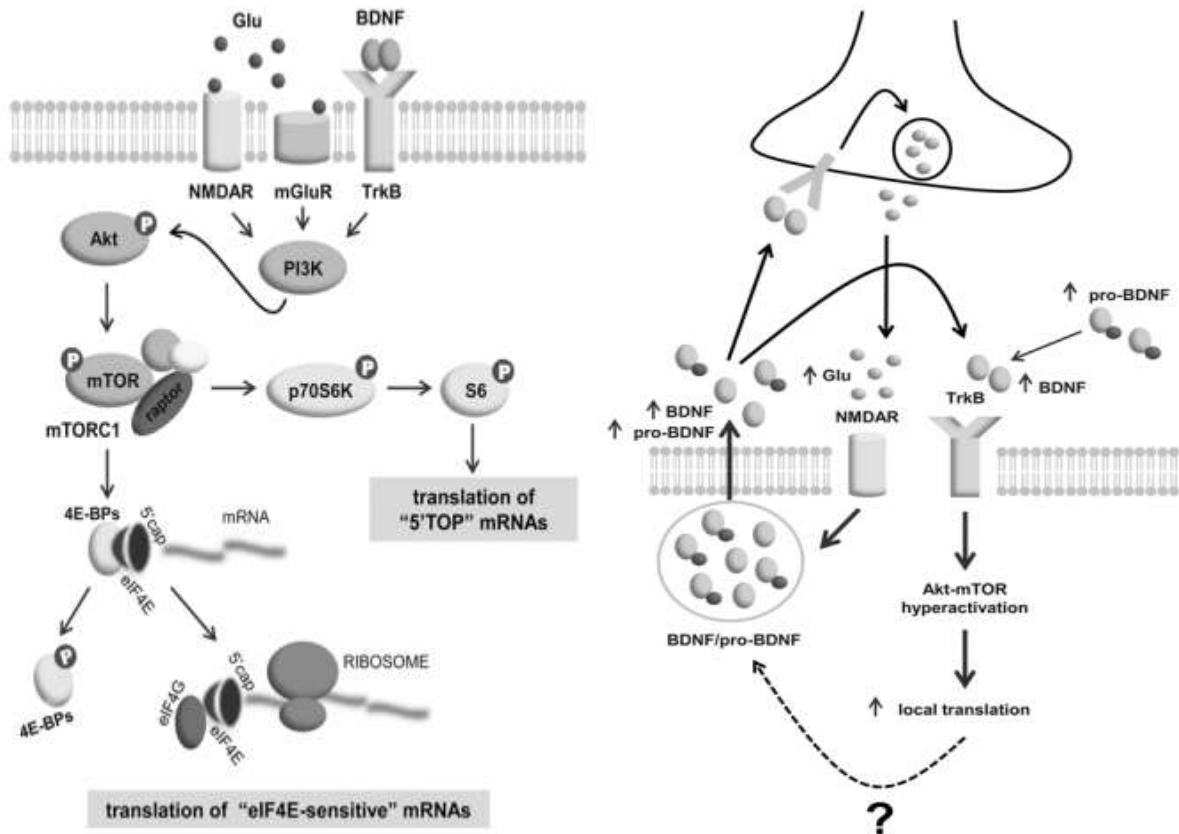


Figura 5. La vía de señalización Akt-mTOR en neuronas. Glutamato (Glu) y BDNF pueden estimular diferentes receptores postsinápticos para activar PI3 quinasa (PI3K), que fosforila Akt e induce la señalización de mTOR. En consecuencia, la traducción de los ARNm "5'TOP" y "eIF4E sensibles" se mejoran con diferentes mecanismos.

Figura 6. La hipótesis del ciclo de retroalimentación positiva glutamatergica en DS. El aumento de la actividad glutamatergica a través de NMDAR induce la liberación mejorada de proteínas BDNF/proBDNF. Pro-BDNF madura extracelularmente en BDNF. El aumento de BDNF extracelular a su vez induce hiperactivación postsináptica de Akt-mTOR a través de los receptores TrkB. En consecuencia, la traducción local de ARNm dendrítico aumentan, lo que probablemente incluye la traducción de ARNm de BDNF. Se estimula la liberación presináptica de glutamato. por BDNF, que contribuye a la mejora de la actividad glutamatergica actividad. (Extraídas de Troca-Marín et. al. 2014)

La vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR regula la proliferación, migración, supervivencia celular, metabolismo y apoptosis.

Por otro lado y paralelamente, las vías de la MAP quinasas, MAP cinasas, vía MAPK/ERK o vía MAPK (de las siglas en inglés Mitogen-Activated Protein

Kinases, o proteína quinasas activadas por mitógenos) es una ruta (Figura 7) de transducción de señal de células de eucariotas que se sitúa corriente abajo de los receptores tirosín quinasas así como la mayoría de receptores para citocina. En términos globales, la señal se transporta mediante GRB2 y de Sos a Ras (una proteína G monomérica). Esta Ras, ya activada, estimula a tres proteínas quinasas que actúan de forma secuencial y que culmina con la activación de la MAP quinasa (también denominada como «ERK»), que es una serín treonín quinasa que es capaz de traslocarse al núcleo para, allí, regular la transcripción modificando la actividad de proteínas (incluyendo factores de transcripción), modulando así la expresión de distintos genes (Duman et al., 2012).

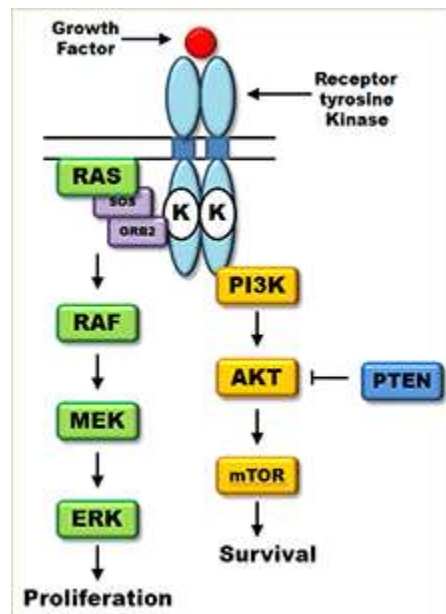


Figura 7. Esquema de las vías de MAPK y PI3K. Factor de crecimiento de unión a los receptores de los resultados de la tirosina quinasa en la activación de la vía de señalización MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK) y la vía PI3K (PI3K-AKT-mTOR).

Por otro lado, los AMPAR potenciados por LY404187 incrementan la utilización de glucosa y expresan la proteína c-fos, indicadora de actividad cerebral (Fowler et al. 2004).

2. OBJETIVOS e HIPÓTESIS

2.1 Objetivos

Caracterizar el perfil antidepresivo de la ampakina de alto impacto LY 404187 mediante:

1. Estudios conductuales de la respuesta antidepresiva tras la administración sistémica de LY 404187 a dosis de 2,5mg/kg y 5mg/Kg a la media hora y una hora.
2. Análisis de los cambios en la liberación de neurotransmisores corticales (glutamato y monoaminas) en respuesta a la administración sistémica de LY 404187 a través de microdiálisis.
3. Caracterización molecular de los cambios producidos en las cascadas aguas abajo de señalización intracelular implicadas en la plasticidad neuronal de las vías glutamatérgicas en la CPFd tras la administración sistémica de LY 404187.

2.2 Hipótesis

- Hipótesis general:

LY404187 es un modulador alostérico positivo (PAM) de alto impacto que produce efectos antidepresivos rápidos (observables a los 30 minutos) y sostenidos en el tiempo (hasta 7 días) cuyo mecanismo de acción vendría mediado por la activación de factores neurotróficos que, a su vez activarían vías de señalización molecular responsables de la transcripción y proliferación de nuevas conexiones o neurogénesis, especialmente en el hipocampo y en la corteza prefrontal.

- Hipótesis secundarias:

1. LY404187 produce efectos antidepresivos rápidos y sostenidos observados en test de conducta.
2. LY404187 provoca una liberación de monoaminas como 5-HT, al igual que los antidepresivos convencionales, pero de una manera más rápida.
3. LY404187 mantiene los niveles de transmisión glutamatérgica inalterados evitando problemas de excitotoxicidad.
4. LY404187 favorece la liberación de factores tróficos como BDNF y la activación de vías de señalización que facilitan los procesos de neurogeneración y plasticidad sináptica. Estos efectos serían los responsables últimos de los efectos antidepresivos.

3. METODOLOGÍA

3.1 Metodología

Para analizar los mecanismos implicados en la acción de LY404187 se han utilizado diversos experimentos con una muestra, cada uno de ellos, de $n=24$ ratas macho. Cada uno de los animales recibía una administración intraperitoneal sistémica de LY404187 o bien de Salino como control experimental.

La muestra utilizada para la realización de test conductual NFT y NSFT, fueron también utilizadas para su posterior disección y toma de muestra de PFC para la homogeneización y cuantificación de proteínas a través de Western Blotting. Todo ello con los controles experimentales requeridos, uso de vehículos, tomas de muestras basales y uso de doble ciego para la cuantificación de los test conductuales.

Para la microdiálisis se utilizó una muestra de 10 ratas macho, cinco para la administración i.p. de LY404187 tras sondarlas, a los 30 min. y otras $n=5$ para las de 1 hora.

La línea temporal seguida en cada uno de los experimentos supone la recogida de muestras, ya sean de secreción de neurotransmisores o de expresión de proteínas, en condiciones basales, a la media hora y a la hora de administración de LY404187 o Salino. Para las pruebas conductuales, la línea temporal de 30 min., 24 horas y 7 días tras la administración de la molécula en estudio.

3.2 Análisis estadístico

Los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 5. Los datos del TNF y NSF fueron sometidos a la prueba t de Student de dos colas para la comparación de dos grupos (controles y LY 404187 2,5 y 5 mg/kg, así como de 30 Min. y 1 hora).

Los resultados de la microdiálisis se analizaron mediante un ANOVA de dos vías de medidas repetidas y en el caso de encontrar diferencias significativas, se realizó el análisis post hoc Newman-Keuls. Los resultados se expresan como la media de los porcentajes respecto al nivel basal de neurotransmisor (100%) \pm SEM.

Para el *western blot*, las diferencias entre cada grupo de tratamiento respecto a su control se determinaron mediante la prueba t de Student de dos colas. Los

resultados se expresan como la media de los porcentajes respecto al grupo control (veh, 100%) \pm SEM. El nivel de significación se estableció como $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efecto antidepresivo de LY404187 en el TNF

La administración de 5 mg/kg de LY404187 produjo un efecto antidepresivo rápido (medido como la reducción de la inmovilidad) que se mantuvo hasta 24 horas después (test+1) y a los 7 días (test+7) (Figura 8).

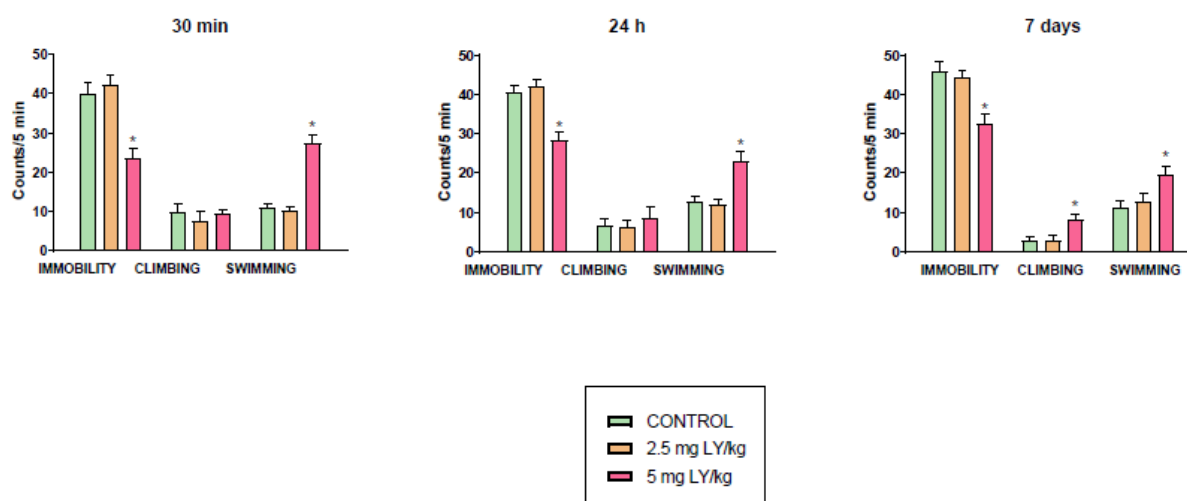


Figura 8. Efecto antidepresivo del LY404187 en el TNF. La administración sistémica de 5 mg/Kg de LY404187 produjo una respuesta antidepresiva en el TNF, medida como la reducción de inmovilidad, que se pudo observar a la hora, a las 24 horas y a los 7 días. * $p < 0.05$, $n = 6$ ratas por grupo, test t de Student de dos colas.

4.2 Efecto antidepresivo de LY404187 en el NSFT

La administración de 5 mg/kg de LY404187 no produjo un efecto ansiolítico, ya que prevaleció la conducta de ansiedad natural de estos animales a campo abierto que la necesidad biológica de tomar alimento tras 24 horas de ayuno. La ingesta de comida tras la prueba no varió respecto al grupo control (Figura 9).

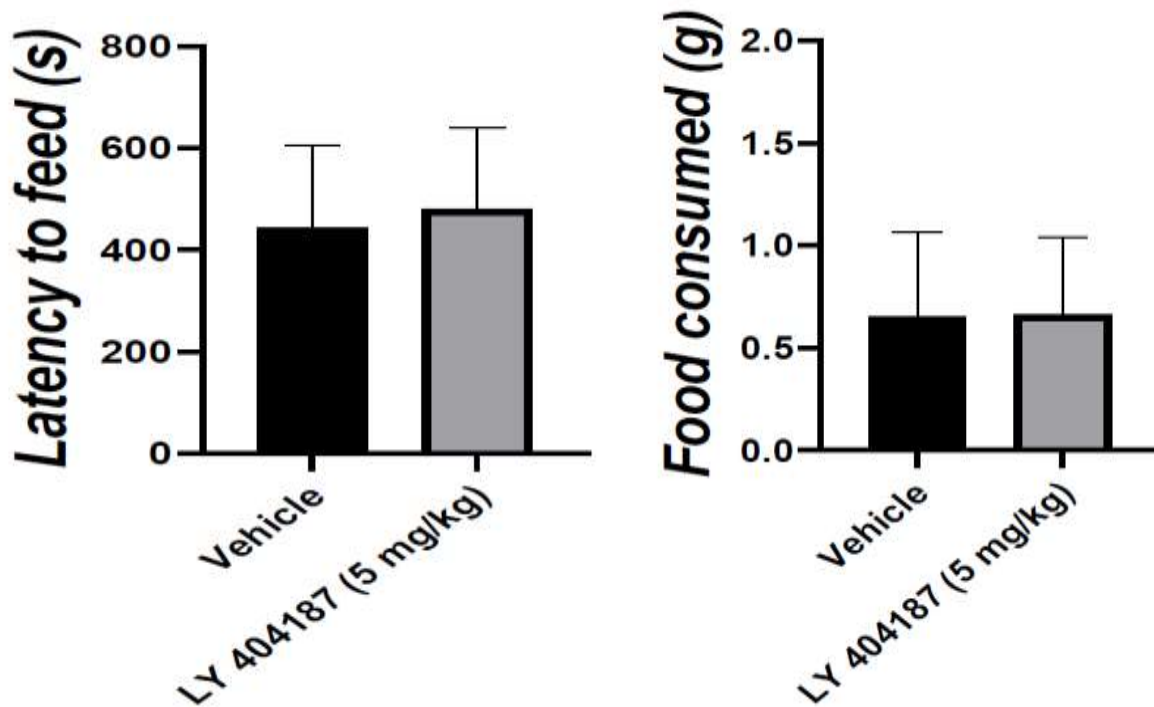


Figura 9. Efecto antidepresivo del LY404187 en NSFT. La administración sistémica de 2,5 y 5 mg/Kg de LY404187 no produjo una respuesta antidepresiva en el NSFT, medida como la latencia en comer y la cantidad de comida ingerida tras la prueba. * $p < 0.05$, $n = 6$ ratas por grupo, test t de Student de dos colas.

4.3 Modificación de la liberación de neurotransmisores en respuesta al tratamiento con LY404187

Tras la colocación de las sondas de microdialisis en el CPFd, se evaluaron los cambios en la liberación a nivel prefrontal de la monoamina 5-HT y glutamato producidos por la administración i.p. de 2,5 y 5 mg/kg de LY404187. Como se puede observar en la Figura 10, la administración sistémica de LY404187 produjo cambios en la concentración extracelular de 5-HT a nivel de la CPFd. Sin embargo, los niveles de glutamato se mantuvieron estables y sin alteraciones.

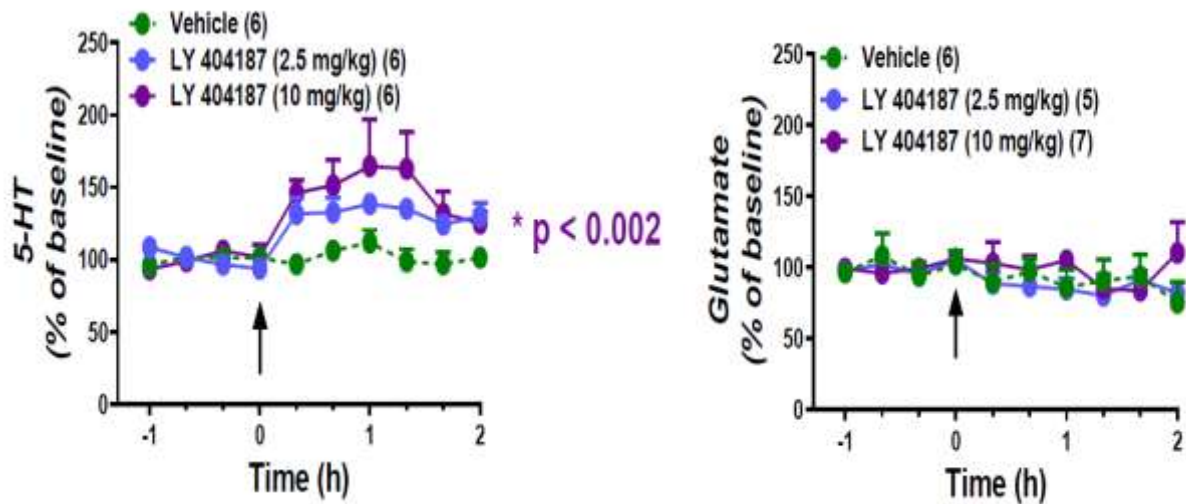


Figura 10. Liberación de neurotransmisores (monoamina 5-HT y glutamato) en la CPFd tras la administración de 2,5 y 5 mg/kg de LY404187. Las primeras 4 muestras se recogieron para obtener los valores basales de neurotransmisores. La flecha muestra el momento de inyección i.p. de LY404187 o de vehículo. La cifra entre paréntesis indica el número de ratas incluidas en cada grupo tras la eliminación con una colocación incorrecta de las sondas.

4.4 Cambios en los marcadores de plasticidad sináptica y en la expresión de proteínas implicadas en la sinapsis de glutamato

Para hacer una primera aproximación a los mecanismos de acción de LY404187 a nivel molecular, se estudió la expresión de las proteínas implicadas en las vías intracelulares de plasticidad sináptica de las sinapsis glutamatérgicas en la CPFd (Figuras 11 y 12).

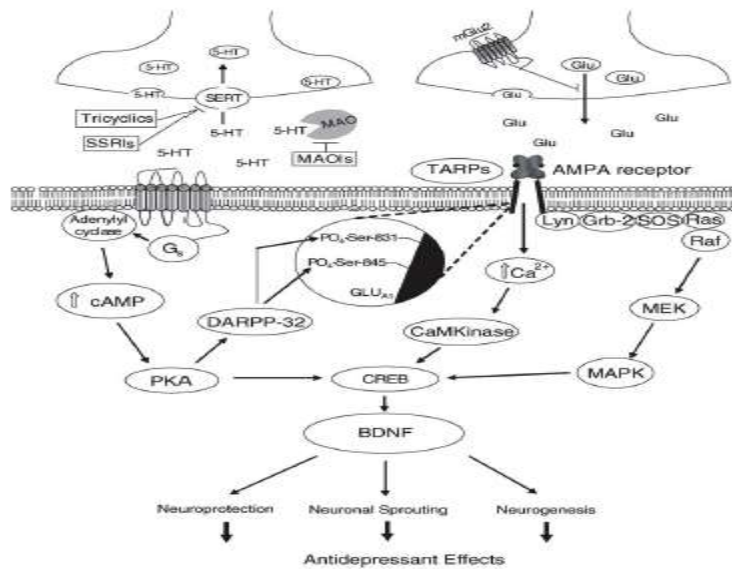


Fig. 11 - Una representación esquemática simplificada de la forma en que los receptores AMPA pueden afectar la depresión y la acción de medicamentos antidepresivos. Los antidepresivos tradicionales aumentan los niveles sinápticos de monoaminas como la serotonina o norepinefrina (no se muestra) ya sea bloqueando su degradación enzimática por la monoamino oxidasa o bloqueando su recaptación a través del transportador de serotonina o transportador de norepinefrina (no mostrado). Esto conduce a la activación de PKA vías que conducen a la inducción de BDNF. Los antidepresivos que aumentan las monoaminas también pueden inducir BDNF a través de Ca^{2+} /Vías de la cinasa CaM (p. Ej., A través de la activación de receptores acoplados a Gq; no se muestra). Bloqueo de la captación de 5-HT por el ISRS. Se ha demostrado que el antidepresivo fluoxetina fosforila la subunidad del receptor AMPA GLUA1 a través del DARPP-32, vía de las fosfoproteínas. La fosforilación de serina específica de GLUA1 a su vez amplifica la señalización de los receptores AMPA. La actividad del receptor AMPA puede resultar en la inducción de BDNF a través de las vías dependientes e independientes de Ca^{2+} + (MAPK). Los receptores de AMPA postsinápticos son activados por glutamato, cuya liberación está regulada por receptores presinápticos metabotrópicos de glutamato, como mGlu2, que inhibe la liberación de glutamato. Además, es probable que haya otras vías: la activación de PKA, por ejemplo, podría inducir CREB a través de mecanismos mediados por MAPK. BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro, CaM Quinasa: Ca^{2+} / proteína quinasa dependiente de calmodulina, cAMP: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico, CREB: unión al elemento de respuesta de Ca^{2+} + / cAMP proteína, DARPP-32: fosfoproteína de Mr 32,000 regulada por dopamina y cAMP, Glu: glutamato, Grb-2: crecimiento proteína de unión al receptor del factor 2, Gs: proteína G estimulante de la adenilil ciclasa, 5HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina), MAO: monoamino oxidasa, IMAO: inhibidores de la monoamino oxidasa, MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos, MEK: MAPK quinasa, PKA: proteína quinasa A, SERT: transportador de serotonina, SOS: hijo de siete sin siete, ISRS: inhibidores selectivos de la captación de serotonina, TARP: proteínas reguladoras del receptor de AMPA transmembrana, y tricíclicos: antidepresivos tricíclicos. (Extraído de Alt et al. 2006).

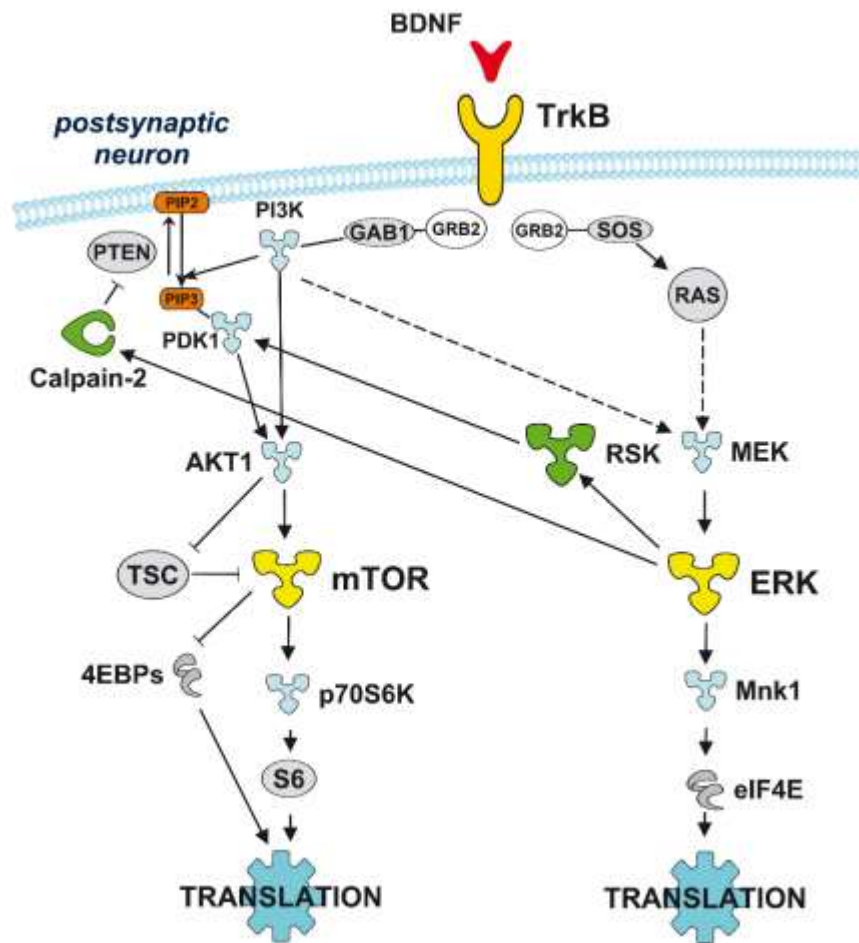
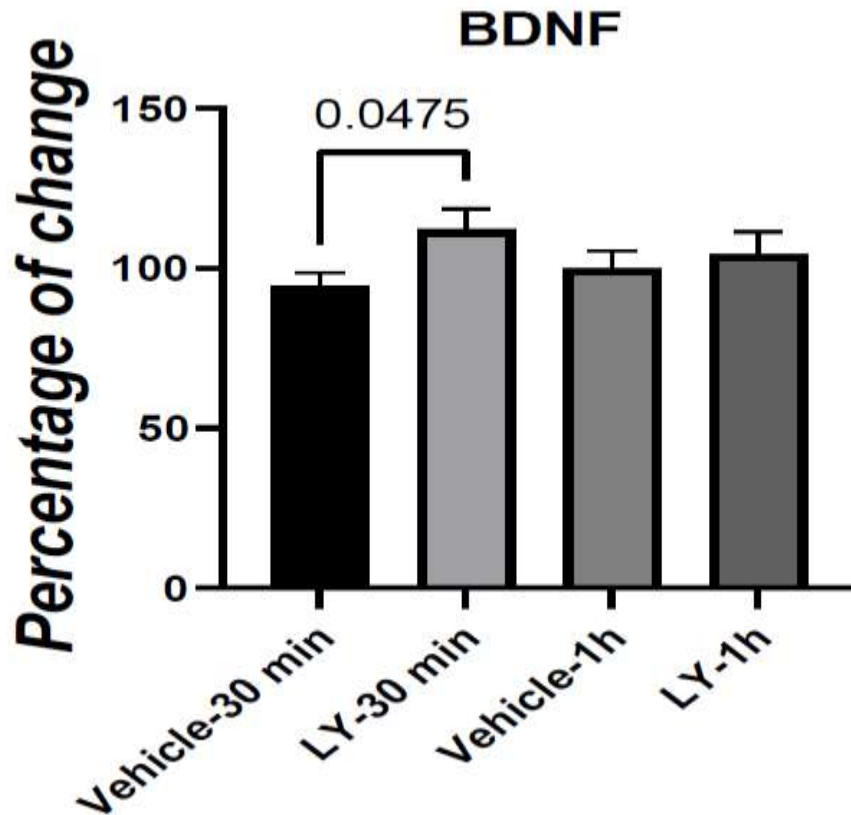


Figura 12. Regulación de la traducción local por BDNF a través de mTOR y ERK. El BDNF puede activar las vías Akt-mTOR y Ras-ERK a través de su interacción con receptores TrkB, produciendo un incremento de las tasas de traducción local.

En la Figura 13 se pueden observar los cambios en la expresión de las proteínas implicadas en la plasticidad sináptica: el BDNF y la tubulina, p-ERK/ERK, AKT y PmTOR/mTOR cuantificados mediante la técnica de western blot. La expresión de BDNF apareció aumentada a los 30 minutos después de la administración i.p. de LY404187. El resto de proteínas no mostró diferencias significativas en sus niveles en ningún momento de la hora transcurrida tras la administración de LY404187.

30 Min.



1 hora



Figura 13. Cambios en la expresión de BDNF en la CPFd cuantificada mediante *western blot*. La expresión fue medida a los 30 minutos y 1 hora tras la administración i.p. de 2,5 o 5 mg/kg de LY404187. BDNF aumentó rápidamente tras la administración del fármaco, a la media hora daba resultados significativos $p = 0.0475$, $p < 0.05$. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de los porcentajes respecto al grupo control (veh, 100%). * $p < 0.05$, $n = 4-5$ ratas por grupo, test t de Student de dos colas. Las muestras se intercalan pareadas entre LY y salino.

Los resultados del WB-BDNF a los 30 Min. son $p = 0,0475^*$, $t=2,339$, $df=8$ con una diferencia entre grupos (LY - Sal) \pm SEM $17,59 \pm 7,519$ al 95% y un intervalo de 0,2476 to 34,92 y R squared (eta squared) de 0,4061. F test para comparar varianzas: F, DF_n, Dfd 2,648, 4 y $P = 0,3685$.

También se estudió la expresión de los marcadores proteicos de las vías ERK y AKT respecto a sus estados fosforilados y la presencia de tubulina, no observándose cambios significativos a lo largo de media y una hora tras la administración i.p. de LY404187. Tampoco se encontraron diferencias significativas en el ratio pERK/ERK.

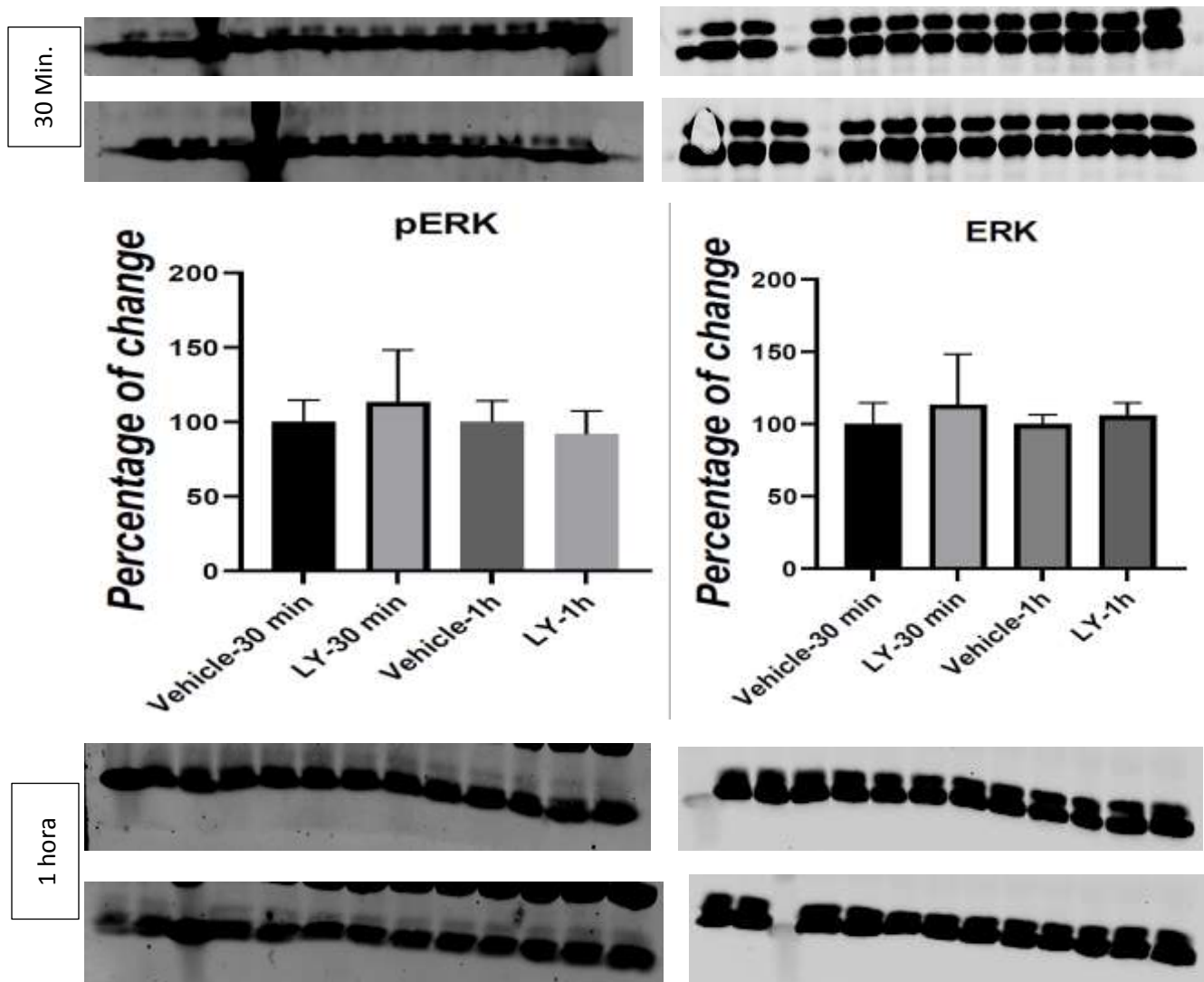


Figura 14. Cambios en la expresión de pERK y ERK en la CPFd cuantificada mediante *western blot*. La expresión fue medida a los 30 minutos y 1 hora tras la administración i.p. de 5 mg/kg de LY404187. Ambas proteínas no presentaron un aumento significativo de su expresión a la media y una hora de tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de los

porcentajes respecto al grupo control (veh, 100%). * $p < 0.05$, $n = 4-5$ ratas por grupo, test t de Student de dos colas. Las muestras se intercalan pareadas entre LY y salino.

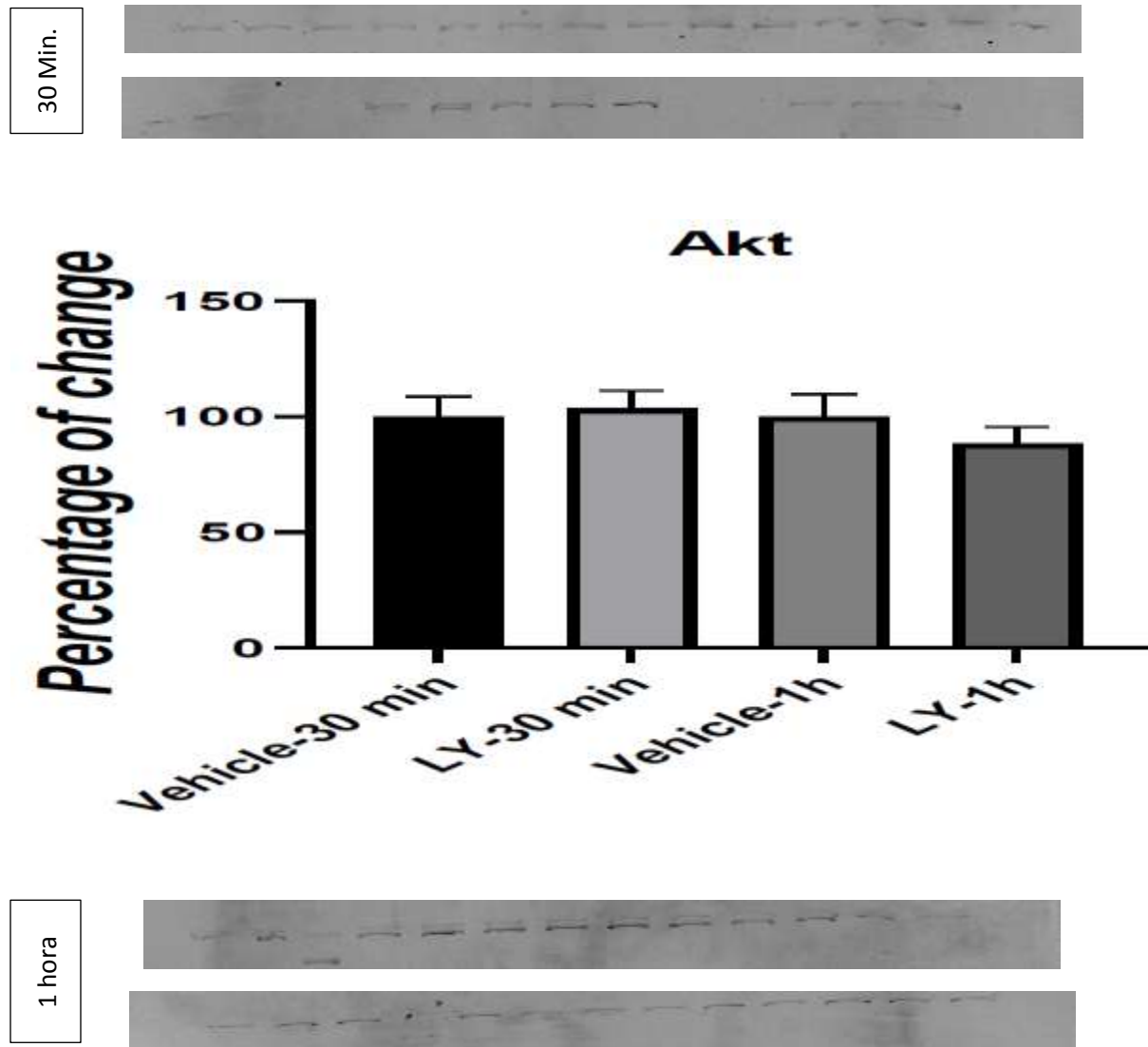


Figura 15. Cambios en la expresión Akt en la CPFd cuantificada mediante *western blot*. La expresión fue medida a los 30 minutos y 1 hora tras la administración i.p. de 5 mg/kg de LY404187. AKT no presentó un aumento significativo de su expresión a la media y una hora de tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de los porcentajes respecto al grupo control (veh, 100%). * $p < 0.05$, $n = 4-5$ ratas por grupo, test t de Student de dos colas. Las muestras se intercalan pareadas entre LY y salino.

Por último, tampoco se observó aumento de la expresión de pmTOR ni mTOR (Figura 16), durante la hora posterior a la administración de LY404187.

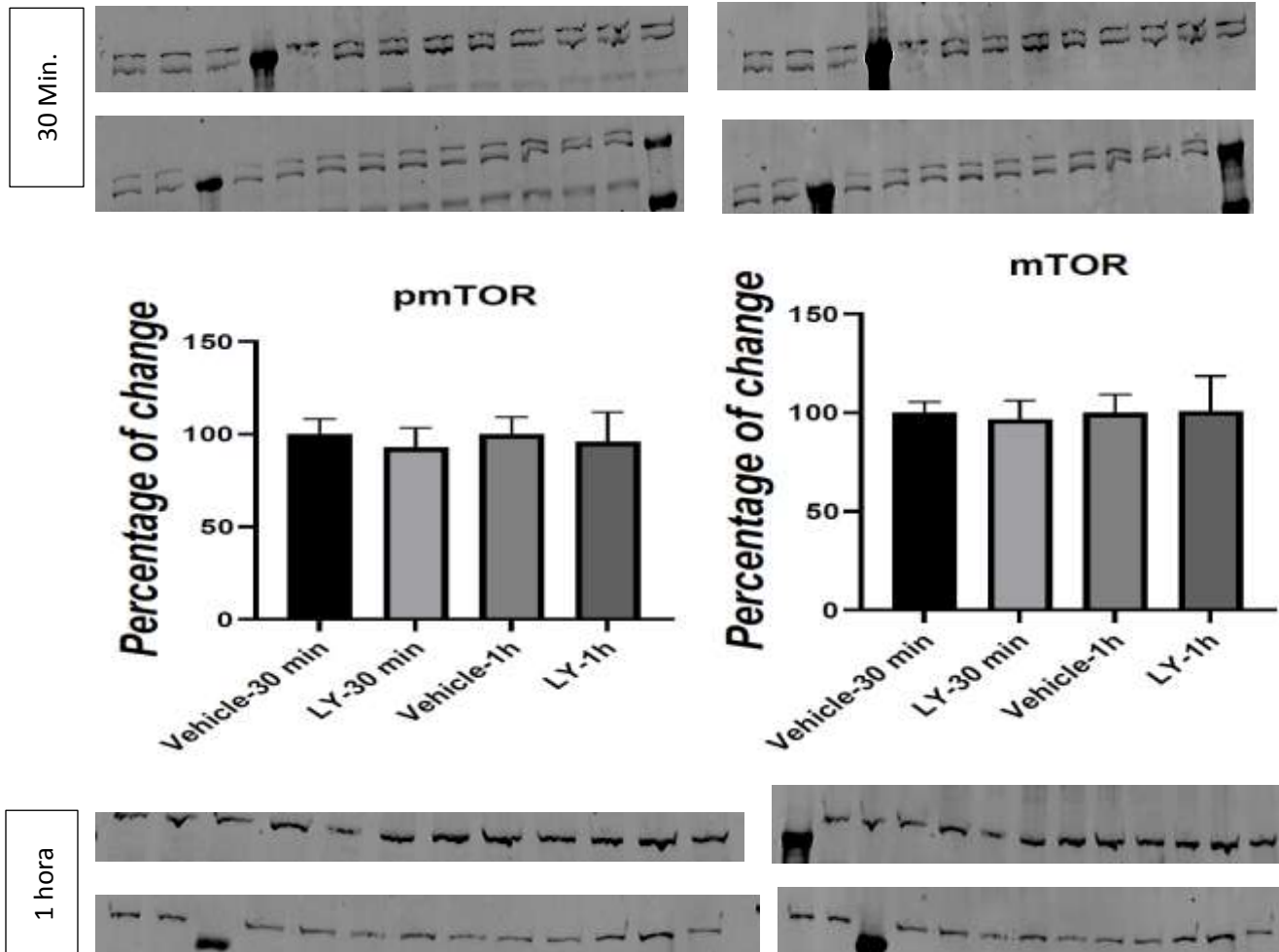


Figura 16. Cambios en la expresión pmTOR y mTOR en la CPFd cuantificada mediante *western blot*. La expresión fue medida a los 30 minutos y 1 hora tras la administración i.p. de 5 mg/kg de LY404187. AKT no presentó un aumento significativo de su expresión a la media y una hora de tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de los porcentajes respecto al grupo control (veh, 100%). * $p < 0.05$, $n = 4-5$ ratas por grupo, test t de Student de dos colas. Las muestras se intercalan pareadas entre LY y salino.

5. DISCUSIÓN

El principal hallazgo de este trabajo es que la ampakina de alto impacto LY404187 produce un efecto antidepresivo rápido, medido como una disminución de la inmovilidad en el TNF, cuando se administra de forma sistémica i.p. Esta disminución rápida (a los 30 minutos) y mantenida (durante 7 días) de la inmovilidad, cursa con un aumento de la natación, estos efectos pueden asociarse a un aumento de serotonina tal como lo definieron Cryan y cols. (2005), puesto que este cambio en la liberación de dicho neurotransmisor se observa tras la administración i.p. sistémica de LY404187 en la dialización durante la microdialisis. Por tanto, otro de los hallazgos respecto a lo observado con la administración de ampakinas de bajo impacto (Gordillo-Salas et al., 2020) es que, este tipo de ampakinas de alto impacto, aumentan los niveles de 5-HT y la estabilidad de los efectos antidepresivos. Podría pensarse que los efectos antidepresivos pudiera deberse a los mismos mecanismos por los que actúan los tratamientos antidepresivos clásicos, sin embargo, ha de haber algún otro mecanismo más allá de la liberación de 5-HT en el SNC ya que, las ampakinas de bajo impacto, han mostrado efectos antidepresivos rápidos, aunque de corta duración, sin un aumento de la liberación de monoaminas por vía i.p. y ello puede ser debido a la activación de AMPARs necesaria para evitar la depresión sináptica y reclutamiento de AMPA. LY404187 actúa preferentemente en los receptores de AMPA GluR2 y GluR4 homoméricos humanos recombinantes frente a GluR1 y GluR3. Además, LY404187 potencia la variante de empalme invertido de estos receptores AMPA en mayor grado que la variante de empalme flop. En los receptores AMPA tanto recombinantes como nativos, la potenciación por LY404187 muestra un crecimiento único dependiente del tiempo que parece implicar una supresión del proceso de desensibilización de estos canales iónicos. Se ha demostrado que LY404187 mejora la transmisión sináptica glutamatérgica tanto in vitro como in vivo. Este aumento de la actividad sináptica se debe a la potenciación directa de la función del receptor AMPA, así como a un reclutamiento indirecto de la actividad del receptor NMDA dependiente del voltaje. Se sabe que la entrada mejorada de calcio a través de los receptores NMDA es un paso crítico para iniciar modificaciones a largo plazo en la función sináptica (p. Ej., Potenciación a largo plazo, LTP) ya que activa el proceso de proliferación de receptores AMPA hacia la membrana que permanecen activos sin la necesidad de entrada de Ca^{+} para activar estos mecanismos por los que glutamato actúa, aumentando la eficiencia del sistema y evitando los peligros de la

toxicidad y apoptosis por Ca^{+} (Quirk et al., 2002) Además, se conoce que LY404187 actúa a través de mecanismos mediados por el receptor de AMPA. La potenciación mediada por S18986 (otra molécula PAM en estudio) de la expresión de la proteína BDNF evocada por (S) -AMPA se atenuó notablemente en condiciones de cultivo libres de Ca^{2+} . Además, de una serie de inhibidores de quinasa, solo el inhibidor de Calmodulin-Kinase II / IV (KN-62, 25 μM) inhibió significativamente (-85%, $P < 0,001$) AMPA + S18986 estimuló la expresión de ARNm de BDNF. Ello respalda las observaciones de que los moduladores alostéricos del receptor de AMPA pueden mejorar la expresión de ARNm de BDNF y la expresión de proteínas a través del receptor de AMPA en neuronas primarias cultivadas (Lockhart et al., 2007). Además, mediante autorradiografía de ^{14}C -2-desoxiglucosa e inmunocitoquímica de c-fos Fowler et al. (2002) lograron determinar los efectos del potenciador del receptor AMPA sobre la utilización de glucosa cerebral y la expresión de c-fos. LY404187 produjo elevaciones significativas en la utilización de glucosa en 28 de las 52 regiones anatómicas analizadas por Fowler et al. (2002), que incluyeron áreas neocorticales rostrales y el hipocampo, así como el núcleo del rafe dorsal, la habénula lateral y el locus coeruleus. No se observaron disminuciones significativas en la utilización de glucosa en ninguna región después de la administración de LY404187. Los aumentos en la utilización de glucosa con LY404187 se bloquearon mediante el tratamiento previo con el antagonista del receptor de AMPA LY293558 (25 mg / kg), lo que indica que LY404187 actúa a través de mecanismos mediados por el receptor de AMPA. LY404187 también produjo aumentos en la inmunorreactividad de c-fos en la corteza, el locus coeruleus y el núcleo del rafe dorsal, áreas muy relacionadas con los efectos antidepresivos ya que, la activación de estas áreas provoca la liberación de otras monoaminas como la noradrenalina, serotonina y dopamina. El aumento de la liberación de serotonina, noradrenalina y dopamina sólo se observa después de una administración intracortical prolongada con ampakinas de bajo impacto. Se ha descrito anteriormente (Heidbreder y Groenewegen, 2003) que las monoaminas prefrontales están implicadas en los procesos atencionales (noradrenalina, originada en el locus coeruleus), la memoria de trabajo (dopamina, originada en el área tegmental ventral) y la flexibilidad conductual (5-HT, originada en el rafe dorsal); todos estos procesos están alterados en la depresión. Por este motivo, el aumento de la transmisión serotoninérgica en la CPFm podría estar asociado con la mejora de las respuestas afectivas, mientras que el aumento de la liberación de dopamina y noradrenalina puede desempeñar un

papel en el tratamiento de los déficits cognitivos y de atención. Por tanto, parece que las ampakinas de alto impacto tendrían una ventaja sobre las de bajo impacto por vida media más larga y sobre los antidepresivos clásicos, al interactuar directamente con los AMPARs, lo que le permite actuar más rápido, no sólo por la capacidad a corto o medio plazo de iniciar procesos de neurogénesis, lo que le proporciona estabilidad de sus efectos al igual que sucede con el tratamiento prolongado con antidepresivos convencionales. La liberación rápida de monoaminas es un efecto que las ampakinas proporcionan de igual modo que otras terapias como la estimulación profunda (ECP), respecto a ésta última, parece aventajarse en cuanto a la estabilidad de los efectos conseguidos a través de otros mecanismos moleculares neurotróficos. De hecho, hay estudios que han demostrado que la 5-HT es imprescindible para un efecto antidepresivo sostenido tanto de la ECP como de la ketamina (Hamani y cols., 2010; Gigliucci y cols., 2013). Mientras que la acción antidepresiva rápida de estos tratamientos no requiere de la transmisión serotoninérgica (Gigliucci y cols., 2013). Parece pues que la dependencia de la 5-HT del efecto antidepresivo aparece más tardíamente, muy posiblemente por su capacidad de producir efectos neurotróficos en la glía (Hisaoka-Nakashima et al., 2016).

Otro de los hallazgos del presente trabajo es que LY404187 produce cambios rápidos en la expresión de proteínas implicadas en las vías de señalización intracelular de plasticidad en las sinapsis glutamatérgicas de la CPFd. Así, LY404187 aumenta la expresión de BDNF a la media hora de ser administrado sistémicamente. Hay estudios que muestran que el estrés crónico impredecible durante 4 semanas disminuye la expresión de BDNF en el hipocampo (Hamani y cols., 2012), mientras que el tratamiento crónico con fármacos antidepresivos es necesario para promover su síntesis (Martinez-Turrillas y cols., 2005; Sen y cols., 2008). Además, el BDNF desempeña un papel importante en la teoría neurotrófica de la depresión y ha sido asociado con el proceso de la neurogénesis (Sairanen y cols., 2005), una síntesis reducida de BDNF es suficiente para producir atrofia de las neuronas del hipocampo y la mPFC (Liu y cols., 2012), además de que es necesario para la acción de los antidepresivos y el bloqueo de su expresión aumenta la vulnerabilidad ante la depresión (Autry y cols., 2009).

En resumen, estos resultados sugieren que el efecto de LY404187 es similar al observado tras el tratamiento crónico con fármacos antidepresivos (Roche y cols., 1997; Romeas y cols., 2009; Mato y cols., 2010) pero en un lapso de tiempo

mucho más corto y una acción más rápida, por lo que podría conseguir el efecto terapéutico deseado mucho antes que los antidepresivos clásicos, que tardan semanas en hacer efecto. La sostenibilidad de sus efectos le aventaja respecto a la ECP y su capacidad de interactuar con los AMPAR reclutando a los NMDAR, le confiere cierta amplitud en su ventana terapéutica respecto a la Ketamina. No obstante, a dosis superiores de 5mg/Kg se han observado efectos adversos semejantes a los producidos por el síndrome serotoninérgico que remiten con el tiempo. Es por este motivo que la utilización de LY404187 requeriría el establecimiento de un índice terapéutico y de una monitorización clínica. No obstante, existen otras moléculas en estudio que tienen como objetivo aumentar la ventana terapéutica de los beneficios que las ampakinas han demostrado. Por ejemplo, se están haciendo experimentos con moléculas potenciadoras de AMPA pero con menores propiedades agonistas como HBT1 que, disminuye la respuesta de campana en la producción de BDNF ([Kunugi et al., 2018](#)). Otro compuesto en estudio es TAK-137, un potenciador del receptor AMPA con poco efecto agonista y que produce un efecto similar al antidepresivo sin causar efectos psicotomiméticos en ratas. La caracterización del potencial de TAK-137 como un nuevo antidepresivo en ratas dio como resultado que, en las neuronas corticales primarias de rata, TAK-137 aumentó la forma fosforilada de Akt, quinasa regulada por señal extracelular, mTOR y quinasa p70S6, y aumentó de manera dependiente de la dosis el nivel de expresión de la proteína BDNF. Además, disminuyó el tiempo de latencia en el test de supresión de alimento con novedades y no se dieron síntomas psicomiméticos como hiperlocomoción y redujo la inhibición prepulso. No obstante, ello también son efectos dependientes de dosis, requeriría el establecimiento de un índice de seguridad como LY404187, pero parece que la ventana terapéutica sería mayor con TAK-137 ([Suzuki et. al. 2019](#)).

7. CONCLUSIONES

- LY404187 tiene un efecto antidepresivo rápido más prolongado que el de ampakinas de bajo impacto, observado en el TNF en que a los siete días se sigue manteniendo significativamente una disminución de la inmovilidad. Ello puede ser debido a la capacidad de los moduladores alostéricos

positivos de alto impacto para ralentizar la activación y desensibilización de AMPA.

- El aumento de la liberación de monoaminas, como 5-HT, en la CPFm producida por LY404187 se observa ya con la administración sistémica, algo que sólo ocurría cuando las ampaquinas de bajo impacto se administraban de forma directa i.c.
- Los niveles de glutamato, permanecen inalterables con LY404187, lo que garantiza una seguridad terapéutica respecto a la ketamina evitando problemas de excitotoxicidad. Sin embargo, parece necesario establecer un ajuste de dosis u obtener un índice para mantener sus efectos antidepresivos sin originar síndrome serotoninérgico y/o síntomas psicomiméticos, ya que se ha observado un aumento de 5-HT dependiente de dosis y síntomas convulsivos o estereotipias al superar dosis de 5mg/Kg.
- El efecto antidepresivo rápido de LY404187 se debe probablemente a la rápida liberación de BDNF que, a su vez, interactuaría con receptores TrkB que activaría las vías de señalización ERK y AKT>mTOR favoreciendo procesos de proliferación neuronal y neuroplasticidad. No obstante, sería conveniente analizar la expresión de proteínas como ERK, AKT y mTOR a las dos horas y 6 horas para confirmar esta hipótesis.
- Por otra parte y dado que se observa liberación de serotonina 5-HT, de cara a investigaciones futuras, sería interesante comprobar si los efectos neurogenerativos se deben a una acción directa de LY404187 sobre la generación de BDNF o bien indirecta y más a largo plazo a través de la liberación de 5-HT. No obstante, TAK-137 ha demostrado aumentar la forma fosforilada de AKT, lo cual lleva a pensar que los PAM actúan de forma directa sobre los procesos de plasticidad sináptica desde la misma neurona. Como ya se dijo, las monoaminas lo harían indirectamente desde la glía (astrocitos y microglía). A corto medio y largo plazo pudiera observarse una acción sinérgica, pero los efectos rápidos parecen ser debidos a la acción directa de los PAM.

8. MATERIALES Y PRUEBAS UTILIZADAS

7.1 *Animales*

Para los experimentos se usaron ratas albinas Sprague-Dawley macho de 250-325 g (Envigo, España), mantenidas con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas (encendido de luces a las 07:00), 22 ± 1 °C y con acceso libre a agua y comida. Todos los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo a la legislación española vigente (RD 53/2013) y a la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas sobre “Protección de los animales usados con propósitos científicos” del 22 de septiembre de 2010 (2010/63/EEC) y fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Cantabria.

7.2 *Tratamientos farmacológicos*

La ampakina LY 404187 (Tabla 2) fue suministrada por Tocris a biotechne brand (Bristol, United Kingdom) y se administró disuelta en 50% dimetil sulfóxido (DMSO, CH₃SOCH₃) a dosis de 2,5 y 5 mg/kg de forma intraperitoneal (i.p.). En el caso de los grupos control se administró el vehículo (Salino) respectivo para cada grupo de tratamiento. La composición de salino es de un 0,9% de cloruro sódico NaCl (sal) disuelto en agua; se les inyecta 1,5 ml de esta composición a cada rata.

Size	50 MG
Storage Conditions	Store at 2-8 degrees celsius
Shipping Conditions	Ship at Ambient Temperature
Formula	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₂ S
CAS Number	[211311-95-4]
HSS Code	29359090

Product Group	Small Molecule
Minimum Purity	> 98%
Solubility	Soluble to 100 mM in DMSO and to 50 mM in ethanol
Molwt	342.46
Referencia	TO-5297/50 MG

Tabla 2. Ficha Técnica de LY 404187

7.3 Microdiálisis

Las sondas de diálisis, que cuentan con una membrana de 4 mm de longitud, se implantaron en ratas ($n = 10$) anestesiadas con pentobarbital (60 mg/kg, ip) en la CPFm (AP +3.2 mm, L -0.6 mm, DV -5.4 mm respecto a bregma), de acuerdo con el atlas estereotáxico (Paxinos y Watson, 2005). Se colocó una sonda medialmente en el PFC. La microdiálisis se llevó a cabo entre 20-24 horas tras la cirugía, en ratas despiertas y con libertad de movimiento, perfundiendo de forma constante las sondas con LCRA (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.26 mM CaCl_2 y 1.18 mM MgCl_2) a 1.65 $\mu\text{L}/\text{min}$. Pasados los 180 primeros minutos de estabilización, se recogieron cada 20 minutos muestras de 30 μL , las 6 primeras muestras se usaron para obtener los valores basales previos al tratamiento y a continuación se procedió a administrar el LY 404187 de forma i.p. (2,5 mg/kg y 5 mg/kg). (300 μM), tras lo cual se recogieron 6 muestras más. Todas las muestras se recogieron en microviales que contenían 5 μl de ácido perclórico 10 mM y se introdujeron en el dispositivo de HPLC (Antec Scientific, Holanda) para determinar la concentración de 5-HT y glutamato. Al siguiente día, es decir, a las 48 horas desde la cirugía esterotáxica, se realiza el mismo procedimiento pero esta vez se les administra salino como vehículo de forma i.p.

7.4 Tinción de cortes cerebrales con hematoxilina

Tras la finalización de los experimentos, se administró a las ratas una sobredosis de pentobarbital, se extrajeron los cerebros y se almacenaron a -80 °C, para posteriormente realizar cortes en un criostato, llevar a cabo una tinción con hematoxilina y comprobar la correcta colocación en la CPFm de las sondas para la microdiálisis (la colocación resultó correcta en todos los casos del estudio).

7.5 Test de natación forzada

El test de natación forzada (TNF, por sus siglas en inglés) modificado o test de desesperación conductual tiene validez predictiva para determinar el potencial antidepresivo de un tratamiento. Se basa en el hecho de que los animales sometidos a una situación de estrés inescapable de corta duración (tanque con agua) desarrollan un comportamiento de inmovilidad (indefensión aprendida) al cabo de un cierto tiempo. Se ha evidenciado que los fármacos antidepresivos reducen este tiempo de inmovilidad (Cryan y cols., 2005).

Durante la semana previa al test, las ratas (n = 10) fueron manipuladas diariamente para habituarlas al contacto con el experimentador. La prueba conductual consta de cuatro fases (Figura 17): el primer día (pretest, 24 horas) se introdujo a las ratas en un tanque cilíndrico de plexiglás (25 cm de diámetro, 46 cm de altura) lleno de agua a 24 ± 1 °C hasta una altura de 30 cm, durante 15 minutos para su habituación. Al día siguiente (test) se administró a las ratas el tratamiento correspondiente (LY 404187 2,5 o 5 mg/kg o vehículo) durante una hora e inmediatamente después se introdujeron en el tanque durante 5 minutos, en los que se evaluó el comportamiento predominante (inmovilidad, natación o escalada) en intervalos de 5 segundos (Figura 16.a). Esta medida se volvió a realizar 24 horas después del tratamiento (test+1) y 7 días después (test+7).

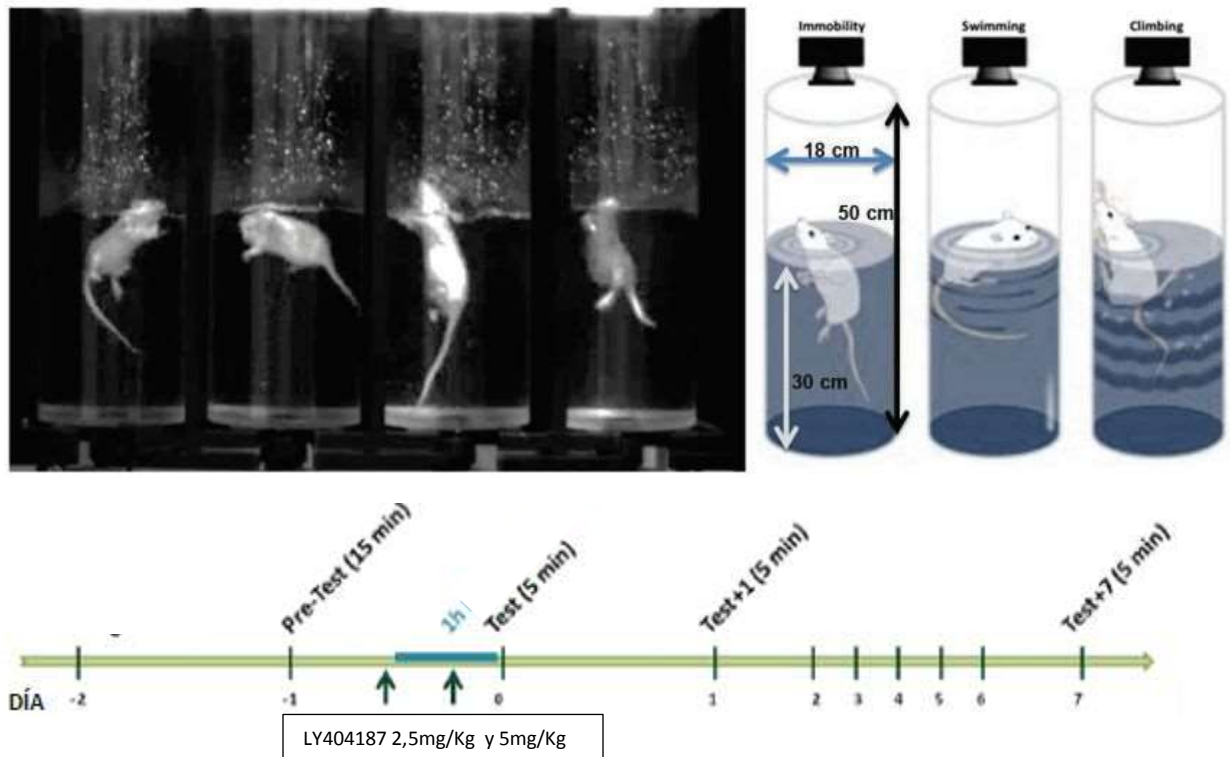


Figura 17. Test de natación forzada. Esquema de los tres tipos de comportamiento que pueden presentar las ratas durante el TNF y línea temporal del experimento.

7.6 Test de alimentación con supresión de novedades

La prueba de alimentación con supresión de novedades (NSF, por sus siglas en inglés) se usa a menudo como una medida de comportamientos similares a la depresión. Al igual que la prueba de campo abierto, la prueba NSF se basa en el miedo innato de los roedores a los espacios nuevos. Sin embargo, la prueba NSF introduce un componente adicional de motivación, ya que el impulso de comer del animal privado de alimentos entra en conflicto con su miedo a los nuevos espacios abiertos, es decir, con la ansiedad. Se sabe que la administración crónica, pero no aguda, de antidepresivos reduce estas latencias hasta que la rata toma el alimento, dando a la prueba NSF una excelente validez predictiva para el transcurso de tiempo de la eficacia antidepresiva (Dulawa et al. 2005)

En nuestro experimento, se privó de alimento a las ratas 24 horas antes de la prueba, con acceso libre al agua y se las trasladó a la sala de pruebas con poca luz una hora antes de la prueba. Las ratas se colocaron en una esquina de un aparato de

campo abierto (17 pulgadas x 17 pulgadas x 12 pulgadas) con paredes y un piso acrílico blanco opaco cubierto de serrín. El nivel de luz en el campo abierto se mantuvo entre 16 y 20 lux y las paredes y el piso se limpiaron con Novalsan (diacetato de clorhexidina) entre las pruebas. Se colocó un gránulo de comida en el centro del campo abierto y se colocaron ratas en una esquina, una cada vez. Se registraron las latencias para acercarse y comenzar a comer con un límite de 15 minutos. Tan pronto como se observó que la rata comía, o se alcanzó el límite de tiempo de 15 minutos, se sacó a la rata del campo abierto y se colocó en la jaula y se observó hasta que comenzó a comer en la jaula doméstica; además, se pesó la cantidad de comida ingerida. La prueba se grabó en vídeo para posterior registro de la conducta.

7.7 Western Blot

Para estudiar la expresión de proteínas tras la administración de LY 404187 i.p. (2,5 y 5 mg/kg), se sacrificaron las ratas ($n = 24$) por decapitación en 2 grupos: a los 30 min y 1h tras el tratamiento. Para cada grupo se estableció un grupo control al que se le inyectó el vehículo (Salino). Posteriormente se extrajeron los cerebros, se diseccionaron las CPF y los Hipocampos en hielo y se almacenaron a -80°C .

Para el lisado de las células, las muestras de CPF derecho se homogeneizaron (1:15) en una solución compuesta por 10 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, y los siguientes inhibidores de proteasas y fosfatasa: 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 0.2 mg/ml aprotinina, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, 10 $\mu\text{g/ml}$ pepstatina A, 10 $\mu\text{g/ml}$ antipaina, 10 $\mu\text{g/ml}$ quimostatina, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 1 mM cantaridina y 1 μM E-64. A esto se le añadió tampón de lisis (1% Igepal®, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS y 2.5 mM CHAPS). Las proteínas solubilizadas se recogieron en el sobrenadante tras centrifugar durante 10 minutos a $14000 \times g$ y 4°C , la cuantificación se realizó mediante el método de Lowry (Lowry y cols., 1951) y se prepararon alícuotas, a las que se añadió tampón de carga (Laemmli Sample Buffer, BIO-RAD, California, Estados Unidos) con β -mercaptoetanol al 5% y se calentaron 5 minutos a 100°C para desnaturalizar las proteínas.

Para cada muestra se cargó 15 μg de proteína (por duplicado) para las muestras de 30 min. Y 12 μg para las de 1 hora en geles SDS-PAGE discontinuos, constituidos por un gel de separación (8 o 15% de acrilamida) y un gel de empaquetamiento (8,5% y 15% de acrilamida). Los geles se introdujeron en las cubetas de

electroforesis (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, BIO-RAD, California, Estados Unidos) con tampón de electroforesis y se sometieron a una corriente de 100 V durante 15 minutos y 160 V durante 50 minutos hasta que se observó que el marcador de peso molecular (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) llegaba al límite del gel. Después las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, sumergidas en tampón de transferencia al 20% de metanol. Las condiciones de transferencia fueron voltaje constante (100 V) durante 90 minutos para las proteínas de alto peso molecular y amperaje constante (40 mA) durante 45 minutos para las de bajo peso molecular, a baja temperatura.

El bloqueo de las uniones inespecíficas se realizó incubando las membranas una hora con leche desnatada en polvo al 3% para detectar proteínas fosforiladas y al 5% para las demás, después se incubaron durante una noche a 4°C con los anticuerpos primarios (Tabla 3) diluidos en leche al 3 y 5%, para marcar la siguientes proteínas: p-mTOR, mTOR, p-ERK, ERK, p-AKT, AKT, tubulina y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

Al día siguiente se lavaron las membranas con Tween 20 al 0,05% en tampón tris salino (TBS-T) y se incubaron durante una hora con anticuerpos secundarios conjugados para detección fluorescente frente a IgG de ratón o conejo, a una concentración 1:15.000, proporcionados por Li-Cor Biosciences (Lincoln, NE, USA). Tras volver a lavar las membranas con TBS-T, la detección de la fluorescencia se llevó a cabo en un escáner Odyssey CLx y para la cuantificación se utilizó el programa Image Studio Lite, ambos de Li-Cor Biosciences (Lincoln, NE, USA). Los valores de densitometría se normalizaron respecto a la banda de tubulina y entre sus respectivos fosforilados.

Antígeno	Peso molecular (kDa)	Casa comercial y referencia	Concentración de uso	Animal de procedencia
p-mTOR	289	Cell Signaling Technology; CS 2971	1:250	Conejo
mTOR	289	Cell Signaling Technology; CS 4517	1:100	Ratón
p-AKT1	62	Santa Cruz Biotechnology; CS 9271	1:500	Conejo
AKT	62	Santa Cruz Biotechnology; SC 5298	1:1.000	Ratón

p-ERK	42-44	Sigma; M 8159	1:1000	Ratón
ERK	42-44	Abcam; Ab-184699	1:1000	Conejo
BDNF	14	Abcam; Ab-108314	1:250	Conejo
Tubulina	55	A80593	1:20000	Ratón Conejo

Tabla 3. Anticuerpos primarios empleados para el marcaje de proteínas en el *western blot*.

Relación de anticuerpos utilizados a lo largo del estudio, indicando el peso molecular de la banda marcada, la casa comercial, la concentración empleada para cada uno de ellos y el animal del que se han obtenido.

Conflictos de interés

La autora declara no tener ningún conflicto de interés.

Contribuciones de la autora

Laura Casasampere Baranda ha contribuido en este trabajo en el planteamiento de objetivos e hipótesis, realización de la metodología, uso de técnicas y obtención de resultados, así como en la interpretación de los mismos y la organización del material bibliográfico disponible y búsqueda en bases de datos como pubmed.

Agradecimientos

El autor desea agradecer especialmente al Dr. Albert Adell, por su interesante Proyecto y dirección al permitir la participación en él en la realización de una parte de éste a través de la estancia y TFM del máster en biología molecular y biomedicina de la UC/UPV-EHU. Del mismo modo, la autora agradece al IBBTEC y CSIC el poder realizar este trabajo dentro de sus instituciones.

9. Referencias bibliográficas

Abdallah C. G., Sanacora G., Duman R. S., Krystal J. H. (2015). Ketamine and rapid-acting antidepressants: a window into a new neurobiology for mood disorder therapeutics. *Annu. Rev. Med.* 66, 509–523.

Adell, A., Garro-Martínez, E. (2020) AMPA receptor potentiators as potential rapid-acting antidepressants (Capítulo de libro aún sin publicar)

Akinfiresoye L, Tizabi Y (2013) Antidepressant effects of AMPA and ketamine combination: role of hippocampal BDNF, synapsin, and mTOR. *Psychopharmacology (Berl)* 230:291-298.

Alt, A., Nisenbaum, E. S., Bleakman, D., & Witkin, J. M. (2006). A role for AMPA receptors in mood disorders. *Biochemical pharmacology*, 71(9), 1273–1288.

Anderson, R. J., Frye, M. A., Abulseoud, O. A., Lee, K. H., McGillivray, J. A., Berk, M., & Tye, S. J. (2012). Deep brain stimulation for treatment-resistant depression: efficacy, safety and mechanisms of action. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 36(8), 1920–1933.

Arantes-Gonçalves, F., & Coelho, R. (2006). Depressão e tratamento. Apoptose, neuroplasticidade e antidepressivos [Depression and treatment. Apoptosis, neuroplasticity and antidepressants]. *Acta medica portuguesa*, 19(1), 9–20.

Arai AC, Xia YF, Rogers G, Lynch G, Kessler M (2002) Benzamide-type AMPA receptor modulators form two subfamilies with distinct modes of action. *J Pharmacol Exp Ther* 303:1075-85.

Autry A.E., Adachi M., Cheng P., Monteggia L.M. (2009). Gender-specific impact of brain-derived neurotrophic factor signaling on stress-induced depression-like behavior. *Biol. Psychiatry*. 66, 84–90.

Bremner, J. D., Narayan, M., Anderson, E. R., Staib, L. H., Miller, H. L., & Charney, D. S. (2000). Hippocampal volume reduction in major depression. *The American journal of psychiatry*, 157(1), 115–118.

Briz, V., Hsu, Y.-T., Li, Y., Lee, E., Bi, X., & Baudry, M. (2013). Calpain-2-mediated PTEN degradation contributes to BDNF-induced stimulation of dendritic protein synthesis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(10), 4317–28.

Cammalleri, M., Lütjens, R., Berton, F., King, A. R., Simpson, C., Francesconi, W., & Sanna, P. P. (2003). Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14368–73.

Casarotto, P. C., Girysh, M., Fred, S. M., Kovaleva, V., Moliner, R., Enkavi, G., Biojone, C., Cannarozzo, C., Sahu, M. P., Kaurinkoski, K., Brunello, C. A., Steinzeig, A., Winkel, F., Patil, S., Vestring, S., Serchov, T., Diniz, C., Laukkanen, L., Cardon, I., Antila, H., ... Castrén, E. (2021). Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors. *Cell*, 184(5), 1299–1313.e19.

Choquet D, Hosy E (2020) AMPA receptor nanoscale dynamic organization and synaptic plasticities. *Curr Opin Neurobiol* 63:137-145.

Cryan J.F., Valentino R.J., Lucki I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29(4-5), 547-569.

Cull-Candy S, Kelly L, Farrant M (2006) Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 16:288-297.

Dulawa, S. C., & Hen, R. (2005). Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 29(4-5), 771–783.

Duman, R. S., & Voleti, B. (2012). Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends in neurosciences*, 35(1), 47–56.

Fowler, J. H., Whalley, K., Murray, T., O'Neill, M. J., & McCulloch, J. (2004). The AMPA receptor potentiator LY404187 increases cerebral glucose utilization and c-fos expression in the rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 24(10), 1098–1109.

Frödin, M., Jensen, C. J., Merienne, K., & Gammeltoft, S. (2000). A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. *The EMBO Journal*, 19(12), 2924–34.

Gigliucci V., O'Dowd G., Casey S., Egan D., Gibney S., Harkin A. (2013). Ketamine elicits sustained antidepressant-like activity via a serotonin-dependent mechanism. *Psychopharmacology (Berl)*. 228, 157–166.

Gordillo-Salas, M., Pascual-Antón, R., Ren, J., Greer, J., & Adell, A. (2020). Antidepressant-Like Effects of CX717, a Positive Allosteric Modulator of AMPA Receptors. *Molecular neurobiology*, 57(8), 3498–3507.

Hamani C., Diwan M., Macedo C.E., Brandão M.L., Shumake J., Gonzalez-Lima F., Raymond R., Lozano A.M., Fletcher P.J., Nobrega J.N. (2010). Antidepressant-like effects of medial prefrontal cortex deep brain stimulation in rats. *Biol. Psychiatry*. 67, 117-124.

Hamani C., Machado D.C., Hipólido D.C., Dubiel F.P., Suchecki D., Macedo C.E., Tescarollo F., Martins U., Covolan L., Nobrega J.N. (2012). Deep brain stimulation reverses anhedonic-like behavior in a chronic model of depression:

role of serotonin and brain derived neurotrophic factor. *Biol. Psychiatry*. 71, 30-35.

Hardingham G.E., Bading H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 682-696.

Hayashi T, Umemori H, Mishina M, Yamamoto T (1999) The AMPA receptor interacts with and signals through the protein tyrosine kinase Lyn. *Nature* 397:72-76.

Heidbreder C.A., Groenewegen H.J. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 555–579.

Hisaoka-Nakashima, K., Kajitani, N., Kaneko, M., Shigetou, T., Kasai, M., Matsumoto, C., Yokoe, T., Azuma, H., Takebayashi, M., Morioka, N., & Nakata, Y. (2016). Amitriptyline induces brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression through ERKdependent modulation of multiple BDNF mRNA variants in primary cultured rat cortical astrocytes and microglia. *Brain research*, 1634, 57–67. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.12.057

Hou, L., & Klann, E. (2004). Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(28), 6352–61.

Ionescu DF, Rosenbaum JF, Alpert JE. Pharmacological approaches to the challenge of treatment-resistant depression. *Dialogues Clin Neurosci.* 2015;17(2):111-126.

Gates, M., Ogden, A., & Bleakman, D. (2001). Pharmacological effects of AMPA receptor potentiators LY392098 and LY404187 on rat neuronal AMPA receptors in vitro. *Neuropharmacology*, 40(8), 984–991.

Jiménez-Sánchez L, Castañé A, Pérez-Caballero L, Grifoll-Escoda M, López-Gil X, Campa L, Galofré M, Berrocoso E, Adell A (2016) Activation of AMPA receptors mediates the antidepressant action of deep brain stimulation of the infralimbic prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 26:2778-2789.

Kew J.N., Kemp J.A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* (Berl). 179, 4-29.

Koot S., Zoratto F., Cassano T., Colangeli R., Laviola G., van den Bos R., Adriani W. (2012) Compromised decision-making and increased gambling proneness following dietary serotonin depletion in rats. *Neuropharmacology*. 62, 1640-1650.

Kunugi, A., Tajima, Y., Kuno, H., Sogabe, S., & Kimura, H. (2018). HBT1, a Novel AMPA Receptor Potentiator with Lower Agonistic Effect, Avoided Bell-Shaped Response in In Vitro BDNF Production. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 364(3), 377–389.

Lapidus, K. A., Soleimani, L., & Murrough, J. W. (2013). Novel glutamatergic drugs for the treatment of mood disorders. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 9, 1101–1112.

Lauterborn JC, Lynch G, Vanderklisch P, Arai A, Gall CM (2000) Positive modulation of AMPA receptors increases neurotrophin expression by hippocampal and cortical neurons. *J Neurosci* 20:8-21.

Legutko B, Li X, Skolnick P (2001) Regulation of BDNF expression in primary neuron culture by LY392098, a novel AMPA receptor potentiator. *Neuropharmacology* 40:1019-1027.

Lindefors N, Ballarin M, Ernfors P, Falkenberg T, Persson H (1992) Stimulation of glutamate receptors increases expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus. *Ann N Y Acad Sci* 648:296-299.

Liu SJ, Zukin RS (2007) Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci* 30:126-134.

Liu R., Lee F.S., Li X.Y., Bambico F., Duman R.S., Aghajanian G.K. (2012). Brain-derived neurotrophic factor Val66Met allele impairs basal and ketamine-stimulated synaptogenesis in prefrontal cortex. *Biol. Psychiatry*. 71, 996–1005.

Lockhart, B. P., Rodriguez, M., Mourlevat, S., Peron, P., Catesson, S., Villain, N., Galizzi, J. P., Boutin, J. A., & Lestage, P. (2007). S18986: a positive modulator of AMPA-receptors enhances (S)-AMPA-mediated BDNF mRNA and protein expression in rat primary cortical neuronal cultures. *European journal of pharmacology*, 561(1-3), 23–31.

Lynch G (2006) Glutamate-based therapeutic approaches: ampakines. *Curr Opin Pharmacol* 6:82-88.

Lynch G, Gall CM (2006) Ampakines and the threefold path to cognitive enhancement. *Trends Neurosci* 29:554-562.

Lüscher C, Malenka RC (2011) Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 69:650-663.

Mackowiak M, O'Neill MJ, Hicks CA, Bleakman D, Skolnick P (2002) An AMPA receptor potentiator modulates hippocampal expression of BDNF: an in vivo study. *Neuropharmacology* 43 :1-10.

Maeng S, Zarate CA Jr, Du J, Schloesser RJ, McCammon J, Chen G, Manji HK (2008) Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry* 63:349-352.

Malberg, J. E., & Blendy, J. A. (2005). Antidepressant action: to the nucleus and beyond. *Trends in pharmacological sciences*, 26(12), 631–638.

Martinez-Turrillas R., Del Río J., Frechilla D. (2005). Sequential changes in BDNF mRNA expression and synaptic levels of AMPA receptor subunits in rat hippocampus after chronic antidepressant treatment. *Neuropharmacology*. 49, 1178-1188.

Panja, D., & Bramham, C. R. (2014). BDNF mechanisms in late LTP formation: A synthesis and breakdown. *Neuropharmacology*, 76, 664–676.

Quirk, J. C., & Nisenbaum, E. S. (2002). LY404187: a novel positive allosteric modulator of AMPA receptors. *CNS drug reviews*, 8(3), 255–282.

Radin DP, Johnson S, Purcell R, Lippa AS (2018) Effects of chronic systemic low-impact amphetamine treatment on neurotrophin expression in rat brain. *Biomed Pharmacother* 105:540-544.

Roche M., Harkin A., Kelly J.P. (1997). Chronic fluoxetine treatment attenuates stressor-induced changes in temperature, heart rate, and neuronal activation in the olfactory bulbectomized rat. *Neuropsychopharmacology*. 32, 1312-1320.

Rueter SM, Burns CM, Coode SA, Mookherjee P, Emeson RB (1995) receptor RNA editing in vitro by enzymatic conversion of adenosine to inosine. *Science* 267, 1491–1494.

Sairanen M., Lucas G., Ernfors P., Castrén M., Castrén E. (2005). Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J. Neurosci*. 25, 1089-1094.

Sen S., Duman R., Sanacora G. (2008). Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biol. Psychiatry*. 64, 527-532.

Shen, M., Lv, D., Li, S., Zhang, Y., Wang, Z., Zhao, C., Chen, X., & Wang, C. (2019). Positive Allosteric Modulation of AMPAR by PF-4778574 Produced Rapid Onset Antidepressant Actions in Mice. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 29(10), 4438–4451.

Sommer B, Keinänen K, Verdoorn TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Köhler M, Takagi T, Sakmann B, Seeburg PH (1990) Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* 249:1580-1585.

Suzuki, A., Murakami, K., Tajima, Y., Hara, H., Kunugi, A., & Kimura, H. (2019). TAK-137, an AMPA receptor potentiator with little agonistic effect, produces antidepressant-like effect without causing psychotomimetic effects in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 183, 80–86. <https://doi-org.unican.idm.oclc.org/10.1016/j.pbb.2019.06.004>

Takei, N., Inamura, N., Kawamura, M., Namba, H., Hara, K., Yonezawa, K., & Nawa, H. (2004). Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-independent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(44), 9760–9

Tang, S. J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A.-C., Sonenberg, N., & Schuman, E. M. (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 467–72.

Troca-Marín, J. A., Casañas, J. J., Benito, I., & Montesinos, M. L. (2014). The Akt-mTOR pathway in Down's syndrome: the potential use of rapamycin/rapalogs for treating cognitive deficits. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 13(1), 34–40.

- Tsokas, P., Ma, T., Iyengar, R., Landau, E. M., & Blitzer, R. D. (2007). Mitogen-activated protein kinase upregulates the dendritic translation machinery in long-term potentiation by controlling the mammalian target of rapamycin pathway. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(22), 5885–94
- Zadran, S., Jourdi, H., Rostamiani, K., Qin, Q., Bi, X., & Baudry, M. (2010). Brain-derived neurotrophic factor and epidermal growth factor activate neuronal m-calpain via mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(3), 1086–95.
- Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D (1990) Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J* 9:3545-3550.
- Zanos P., Moaddel R., Morris P.J., Georgiou P., Fischell J., Elmer G.I., Alkondon M., Yuan P., Pribut H.J., Singh N.S., Dossou K.S., Fang Y., Huang X.P., Mayo C.L., Wainer I.W., Albuquerque E.X., Thompson S.M., Thomas C.J., Zarate C.A. Jr., Gould T.D. (2016). NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature*. 533, 481-486.
- Zarate, C. A., Jr, & Manji, H. K. (2008). The role of AMPA receptor modulation in the treatment of neuropsychiatric diseases. *Experimental neurology*, 211(1), 7–10.